

# TESIS DOCTORAL

## INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS Y HONGOS EN *PINUS PINASTER* AIT.



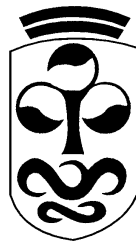
MONTSERRAT PESTAÑA NIETO

VIGO, 2009



UNIVERSIDADE DE VIGO  
DEPARTAMENTO DE ECOLOXÍA E BIOLOXÍA ANIMAL

UNIVERSIDADE DE VIGO  
DEPARTAMENTO DE ECOLOXÍA E BIOLOXÍA ANIMAL



**INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS Y  
HONGOS EN *PINUS PINASTER* AIT.**

TESIS DOCTORAL

Montserrat Pestaña Nieto

Vigo, 2009





Adolfo Cordero Rivera, catedrático de ecología de la Universidade de Vigo y tutor de la tesis, certifica que el trabajo titulado “Interacciones ecológicas entre insectos y hongos en *Pinus pinaster* Ait.” ha sido realizado por la Licenciada en Biología Montserrat Pestaña Nieto bajo la dirección de la Dra. Serena Santolamazza Carbone, investigadora contratada del Centro de Investigación Forestal de Lourizán (Consellería de Medio Rural-Xunta de Galicia), y autoriza su presentación como Tesis de Doctorado en el Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidad de Vigo.

En Pontevedra a 9 de octubre de 2009

VºBº del Director de la Tesis

VºBº del Tutor de la Tesis

Serena Santolamazza Carbone

Adolfo Cordero Rivera



Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados o están en trámite de publicación en las siguientes revistas:

- Pestaña Nieto, M. Santolamazza Carbone, S., 2009. Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. **Mycorrhiza** 19:91-98.
- Pestaña, M. Santolamazza Carbone, S., 2009. Defoliation negatively affects plant growth and the ectomycorrhizal community of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). (**en revisión**).
- Pestaña, M. Santolamazza Carbone, S., 2009. Ecological interactions between *Pissodes castaneus* DeGeer and *Leptographium serpens* (Goid.) M.J. Wingf. in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) (**en revisión**).





**A mi familia,**



*“Acércate a la luz de las cosas. Deja que la naturaleza sea quien te enseñe”*

**Willian Wordsworth**



## **Agradecimientos**

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y dedicación por mi parte, no hubiera sido posible sin la ayuda de cada una de las personas que se citan a continuación.

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a mi directora de tesis Serena Santolamazza Carbone porque creo que sin ella este trabajo nunca habría sido posible, gracias por confiar en mi y brindarme esta oportunidad. Quiero darle las gracias por todo lo que me ha enseñado a nivel profesional, así como por el gran apoyo y la incansable dedicación que ha mostrado en la elaboración de esta tesis.

A todos los que han contribuido en el duro trabajo de campo y de laboratorio, como a Marina Peleteiro, y principalmente a Pepe Gómez Bragaña porque me ha enseñado mucho y ha aportado a este trabajo toda su experiencia sobre el mundo forestal acumulada durante muchos años, un bien muy valioso que no se encuentra en los libros. También quiero agradecer, a toda la gente que ha pasado por el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Forestal de Lourizán y han aportado su granito de arena en la elaboración de este trabajo, así como al Laboratorio de Genética y de Edafología por permitirnos utilizar sus instalaciones.

Quiero hacer una mención especial a la Dra. Ana de Miguel del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Navarra por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por su hospitalidad, así como por transmitirme sus valiosos conocimientos acerca de la descripción morfológica de las micorrizas y por el interés que ha mostrado durante el desarrollo de este trabajo.

Por último y de forma intencionada, he dejado los agradecimientos para las personas que siempre han estado a mi lado. Quiero agradecer hoy y siempre a mi familia todo lo que han luchado en la vida para poder ofrecerme esta oportunidad de futuro. A Berto, quiero agradecerle la comprensión mostrada durante todos estos años, ya que muchas de las horas aquí invertidas se las he robado a él, y a pesar de ello me ha prestado siempre el apoyo y cariño necesarios. A mis amigos y compañeros de carrera quiero darles las gracias por haber estado ahí en los buenos y malos momentos brindándome su apoyo y amistad.

Para la realización de este trabajo he contado con una beca predoctoral concedida por la Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible (Xunta de Galicia) desde 2006

hasta 2009. El estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-INIA a través del proyecto “Interacción hongo-planta-insecto en el ecosistema de *Pinus pinaster* para aclarar la dinámica de algunas importantes patologías” (RTA 2006-00124-00-00).







<b>1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Las interacciones ecológicas .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. <u>Neutralismo</u> .....	4
1.1.2. <u>Comensalismo</u> .....	4
1.1.3. <u>Amensalismo</u> .....	5
1.1.4. <u>Competencia</u> .....	6
1.1.5. <u>Depredación y parasitismo</u> .....	7
1.1.6. <u>Mutualismo</u> .....	10
1.1.7. <u>Mutualismo influenciado por otros organismos</u> .....	11
1.1.7.1. Mutualismo mantenido por un enemigo natural de una de las partes .....	12
1.1.7.2. Mutualismo mantenido por un competidor de una de las partes .....	12
1.1.7.3. Mutualismo alterado por antagonistas de una de las partes .....	13
1.1.7.4. Mutualismo alterado por mutualistas de una de las partes .....	14
1.1.7.5. Mutualismo alterado por especies que explotan el mutualismo .....	15
1.1.7.6. Mutualismo alterado por causas antropogénicas .....	15
<b>1.2. Interacciones ecológicas en el ecosistema de Pinus pinaster Ait. ....</b>	<b>17</b>
<b>2. CAPÍTULO II: INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS DEFOLIADORES Y HONGOS SIMBIONTES EN PLANTAS DE PINUS PINASTER AIT. ....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Introducción .....</b>	<b>27</b>
2.1.1. <u>Los hongos micorrícicos</u> .....	27
2.1.2. <u>Ecología de las ectomicorrizas</u> .....	33
2.1.3. <u>El análisis molecular para la identificación de las ectomicorrizas</u> .....	36
2.1.4. <u>Interacción entre las micorrizas, los herbívoros y las plantas</u> .....	41
2.1.4.1. Efecto de los herbívoros sobre los hongos micorrícicos .....	42
2.1.4.2. Efecto de los hongos micorrícicos sobre los herbívoros .....	47
<b>2.2. Objetivos del estudio.....</b>	<b>49</b>
<b>2.3. Materiales y métodos .....</b>	<b>49</b>
2.3.1. <u>Descripción de las zonas de estudio</u> .....	49
2.3.1.1. Parcela A.....	50
2.3.1.2. Parcela B.....	52
2.3.2. <u>Parámetros edáficos</u> .....	53
2.3.3. <u>Diseño experimental</u> .....	54
2.3.4. <u>Recogida de muestras y limpieza en el laboratorio</u> .....	56
2.3.4.1. Porcentaje de micorrización .....	57
2.3.5. <u>Descripción morfológica de las ectomicorrizas (morfortipos)</u> .....	58
2.3.5.1. Características morfológicas .....	59
2.3.5.2. Características anatómicas del manto.....	61
2.3.5.3. Características de los elementos que emanan .....	62
2.3.5.4. Tipo exploratorio .....	65
2.3.6. <u>Análisis molecular de la ectomicorrizas</u> .....	67
2.3.6.1. Amplificación y secuenciación de ADN .....	67
2.3.6.2. Identificación de las especies .....	68
2.3.7. <u>Parámetros ecológicos</u> .....	69
2.3.7.1. Abundancia y frecuencia relativa. Valor de importancia .....	69
2.3.7.2. Proporción de especies con poca y mucha biomasa .....	70
2.3.7.3. Riqueza y diversidad.....	70
2.3.8. <u>Análisis estadísticos</u> .....	70
<b>2.4. Resultados .....</b>	<b>71</b>
2.4.1. <u>Variables de crecimiento de los árboles</u> .....	71
2.4.2. <u>Caracterización de la comunidad de ectomicorrizas</u> .....	73

2.4.2.1.	Análisis molecular de las ectomicorrizas .....	75
2.4.2.2.	Caracterización morfológica de las principales especies de micorrizas .....	79
2.4.3.	<u>Parámetros ecológicos de los ápices micorrizados</u> .....	98
2.4.3.1.	Abundancia y frecuencia relativa. Valor de importancia .....	98
2.4.3.2.	Porcentaje de micorrización, riqueza y diversidad .....	100
2.4.3.3.	Proporción de especies con poca y mucha biomasa .....	104
2.4.4.	<u>Parámetros ecológicos de los carpóforos</u> .....	105
2.4.4.1.	Identificación taxonómica .....	105
2.4.4.2.	Abundancia, frecuencia relativa y biomasa. Valor de importancia .....	105
2.4.4.3.	Riqueza y diversidad.....	111
<b>2.5.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>112</b>
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO III: INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS XILÓFAGOS Y HONGOS PATÓGENOS .....</b>	<b>120</b>
<b>3.1.</b>	<b>Influencia de la colonización de <i>Leptographium serpens</i> en plantas de <i>Pinus pinaster</i> sobre la biología del gorgojo del pino <i>Pissodes castaneus</i> .....</b>	<b>125</b>
3.1.1.	<u>Introducción</u> .....	125
3.1.1.1.	Importancia de los hongos en la dieta de los insectos xilófagos .....	125
3.1.1.2.	Biología y ecología de <i>Pissodes castaneus</i> De Geer.....	126
3.1.1.3.	Biología y ecología de <i>Leptographium serpens</i> (Goid.) M.J. Wingf.....	131
3.1.2.	<u>Objetivos del estudio</u> .....	132
3.1.3.	<u>Material y Métodos</u> .....	133
3.1.3.1.	Captura y cría de <i>Pissodes castaneus</i> .....	133
3.1.3.2.	Cultivo de <i>Leptographium serpens</i> .....	133
3.1.3.3.	Diseño experimental .....	134
3.1.3.4.	Análisis estadísticos .....	137
3.1.4.	<u>Resultados</u> .....	138
3.1.4.1.	Tratamiento en otoño-invierno .....	138
3.1.4.2.	Tratamiento en primavera-verano .....	140
3.1.4.3.	Efecto estacional.....	143
3.1.5.	<u>Discusión</u> .....	145
<b>3.2.</b>	<b>Capacidad de <i>Pissodes castaneus</i> para transportar e inocular esporas de <i>Leptographium serpens</i> en plantas de <i>Pinus pinaster</i> .....</b>	<b>148</b>
3.2.1.	<u>Introducción</u> .....	148
3.2.2.	<u>Objetivos del estudio</u> .....	150
3.2.3.	<u>Material y métodos</u> .....	150
3.2.3.1.	Experimento 1: ¿Puede <i>P. castaneus</i> transportar esporas de <i>L. serpens</i> ? .....	150
3.2.3.2.	Experimento 2: ¿Puede <i>P. castaneus</i> determinar la contaminación de plantas sanas? .....	151
3.2.4.	<u>Resultados</u> .....	153
3.2.5.	<u>Discusión</u> .....	154
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>157</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXO I.....</b>	<b>187</b>

## 1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

---





## 1.1. Las interacciones ecológicas

En 1859, Charles Darwin resaltó en su obra “El origen de las especies” la importancia de las relaciones tróficas que se establecen entre distintos organismos. En un famoso párrafo decía: *“Mediante experimentos he descubierto que los abejorros son indispensables para la fertilización de algunos tipos de trébol. [...] De esto se puede inferir que si el género completo de abejorros se extinguiere en Inglaterra, el trébol rojo se haría muy raro, o desaparecería completamente. El número de abejorros en cualquier zona depende en gran medida del número de ratones de campo, que destruyen sus nidos y panales. Actualmente el número de ratones depende básicamente, como todo el mundo sabe, del número de gatos; el Coronel Newman dice: “Cerca de los pueblos y pequeñas ciudades, he encontrado que los nidos de abejorros son más abundantes que en otras partes, lo que es atribuido al número de gatos que destruyen a los ratones”. ¿Por lo tanto es posible que la presencia de felinos en gran número pueda determinar, por medio de la intervención primero de los ratones y después de los abejorros, la frecuencia de ciertos tipos de flores en esta zona!”*. Sin duda Darwin contribuyó a impulsar definitivamente un estudio más riguroso de la Historia Natural, al reconocer la importancia de las interacciones entre distintos organismos para el funcionamiento de los ecosistemas. Sin embargo no fue hasta 1869 cuando apareció por primera vez la definición del término “ecología”, en donde se destacaba la importancia del estudio científico de las interacciones entre los organismos. El biólogo alemán Ernst Haeckel, seguidor de la teoría darwiniana de la evolución, definió en general la ecología como el estudio de las relaciones de un organismo con su ambiente orgánico e inorgánico, y en particular como el estudio de las relaciones “amistosas” (positivas) o negativas entre las plantas y los animales (Haeckel 1866).

Es conocido que los ecosistemas terrestres y acuáticos están formados por comunidades de organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos, cuyas interacciones determinan su abundancia, distribución y diversidad (Whittaker 1972; Hudson 1994; van der Putten et al. 2001; Bardgett & Wardle 2003; Wardle et al. 2004). Según una visión simplista de los hechos, las interacciones entre dos poblaciones de organismos pueden ser positivas, negativas o neutras (Tabla 1) para el crecimiento de ambas en función de las especies implicadas y de las circunstancias ambientales (McNaughton & Wolf 1984). A continuación se detallarán los distintos tipos de interacciones que se pueden establecer entre dos poblaciones.

**Tabla 1.** Distintos tipos de interacción entre poblaciones (McNaughton & Wolf 1984)

Interacción	Influencia en el crecimiento de la población	
	Población 1	Población 2
Neutralismo	0	0
Comensalismo	+	0
Amensalismo	-	0
Competencia	-	-
Depredación y parasitismo	+	-
Mutualismo	+	+

### 1.1.1. Neutralismo

El neutralismo describe la relación entre dos especies que interactúan entre sí, aunque no se afectan mutuamente en ningún aspecto de su biología y ecología (McNaughton & Wolf 1984). En realidad el neutralismo es muy difícil de probar y posiblemente no exista en la naturaleza. Considerando la increíble complejidad de los ecosistemas, es prácticamente imposible que dos organismos no se afecten mutuamente de forma positiva o negativa. Considerando que el neutralismo es muy raro o inexistente, el término se suele usar para indicar una situación puntual en donde la competencia o los beneficios obtenidos son imperceptibles.

### 1.1.2. Comensalismo

Se trata de un tipo de interacción que determina un efecto positivo sobre una población y un efecto neutro sobre la otra. En principio el término (*cum + mensa* = en la misma mesa) fue acuñado para indicar los beneficios que obtienen ciertos animales que se alimentan de los restos de comida de otros seres. Sucesivamente se incluyeron los conceptos de *foresis* (transporte a expensas de otro animal), *inquilinismo* (convivencia) y *tanatocresia* (utilización de individuos muertos o de alguna parte de estos como soporte o protección), todos ellos ejemplos de interacciones en donde sólo una población obtiene un claro beneficio.

Los paguroideos (Crustacea, Paguroidea) son una superfamilia de crustáceos decápodos marinos, conocidos popularmente como cangrejos ermitaños. Estos crustáceos representan un ejemplo de tanatocresia, ya que utilizan conchas de caracol para cubrir la parte final del abdomen que no está recubierta por el exoesqueleto. Por otra parte, un claro ejemplo de

inquilinidad en el reino vegetal está representado por algunas plantas epífitas pertenecientes a la familia Bromeliaceae, que abundan en la selva de Argentina, Brasil, Ecuador y Uruguay. En la naturaleza estas plantas, como por ejemplo la *Tillandsia* spp., crecen normalmente encima de árboles, sin llegar nunca a convertirse en parásitos (Benzing 1980).

En un estudio llevado a cabo en Papua Nueva Guinea desde 1966 hasta 1978, se demostró que los pseudoescorpiones del género *Megachernes* (Pseudoscorpionida, Chernetidae) se asocian habitualmente a mamíferos marsupiales para ser transportados (Durden 1991). Después de examinar cientos de mamíferos, se encontraron 471 individuos del género *Megachernes*, pertenecientes principalmente a las especies *M. papuanus* Beier y *M. limatus* Hoff. Los animales que los transportaban eran sobre todo roedores marsupiales como *Antechinus wilhelmina* Tate (Dasyuridae) y al menos diez especies de roedores de la familia Muridae, incluyendo *Rattus niobe* Thomas, *R. novaeguineae* Taylor & Calaby y *Melomys rubex* Thomas. Cada uno de ellos podía llegar a transportar hasta 54 pseudoescorpiones.

### 1.1.3. Amensalismo

Este tipo de interacción determina un efecto negativo para una especie y un efecto neutro para la otra. Un ejemplo de este fenómeno es la alelopatía, que es la producción por parte de ciertas plantas de compuestos químicos, como los monoterpenos, que limitan el desarrollo y el crecimiento de otros vegetales (Reigosa et al. 2006) y de organismos del suelo, incluyendo bacterias (Souto et al. 2001), nemátodos (Shaukat et al. 2002), hongos patógenos y micorrizas (Souto et al. 2000). Un claro ejemplo de este fenómeno es el árbol de origen australiano *Acacia dealbata* Link. En el siglo XIX, esta especie fue introducida como planta ornamental en el sur de Europa, pero en la actualidad se ha convertido en una especie invasora que se extiende desde Portugal hasta Italia (Sheppard et al. 2006). Actualmente la planta está ampliamente distribuida en la comunidad gallega, donde ha invadido los bosques autóctonos y se ha convertido en un serio problema medio ambiental. Este árbol tiene un alto potencial alelopático que dificulta la germinación de otras plantas, creando un horizonte monoespecífico y amenazando seriamente la diversidad local (Casal et al. 1985; Souto et al. 2001).

Otro ejemplo de amensalismo está representado por las bacterias y los hongos del suelo capaces de liberar sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento de otros organismos. Los actinomicetos (Actinobacteria, Actinomycetales) de los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y

*Micromonospora* pueden sintetizar sustancias como estreptomicina, cloranfenicol, cicloheximida y clorotetraciclina. Esta capacidad es bastante común también en las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y en los hongos de los géneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Fusarium* que producen antibióticos capaces de inhibir el desarrollo de otros hongos, bacterias y actinomicetos (De Weger et al. 1995).

#### 1.1.4. Competencia

La competencia generalmente es una interacción doblemente negativa, experimentando las especies implicadas una tasa de crecimiento reducida debido al hecho de compartir una serie de recursos limitados en cantidad y variables en calidad. La competencia puede ocurrir entre individuos de la misma especie (competencia intraespecífica) o de especies diferentes (competencia interespecífica) que utilizan el mismo recurso (luz, alimento, espacio, etc.).

El concepto de competencia es una de las piedras angulares de la ecología evolutiva. De hecho, Charles Darwin basó su idea de la selección natural en el concepto de competencia y lucha por la supervivencia (Darwin 1859). El estudio de la competencia en condiciones naturales exige el conocimiento de los nichos ecológicos que ocupan las distintas especies. El concepto formal de “nicho” incluye todos los elementos bióticos y abióticos con los cuales los organismos interactúan y las adaptaciones a estos. El nicho ecológico permite que en un área determinada convivan e interactúen muchas especies de herbívoros, carnívoros y omnívoros, habiéndose especializado cada una de ellas en una determinada planta o presa, sin llegar nunca a solaparse (McNaughton & Wolf 1984; Molles 2002).

Un claro ejemplo de competencia por el espacio lo proporciona el pez territorial *Stegastes planifrons* Cuvier (Perciformes, Pomacentridae) que se distribuye por las barreras de coral en el oeste del Océano Atlántico. Cada individuo protege territorios de menos de 1 m<sup>2</sup>, que se distribuyen a lo largo de toda la barrera de coral y contienen la mayor parte de los recursos que esta especie necesita, como las grietas en donde protegerse de los depredadores, las zonas con algas de rápido crecimiento para alimentarse y, en los territorios de los machos, un área para reproducirse. Estos peces vigilan continuamente su territorio, atacando violentamente a cualquier intruso. Los individuos que no tienen un espacio propio viven en áreas marginales a la espera de una oportunidad. En el momento en el que quede un territorio libre, los nuevos candidatos de esta especie o de otras, como *S. variabilis* Castelnau, se enfrentan en una violenta lucha para hacerse con el nuevo espacio rico en recursos (Robertson et al. 1981; Robertson 1996; Molles 2002).



En otros casos, la competencia no es tan dramática como en los peces territoriales y no siempre se resuelve tan rápidamente. En 1931 se realizó un estudio en un bosque maduro de *Pinus strobus* L. en New Hampshire (EEUU) para comprobar si las raíces de los pinos competían con las raíces de otras plantas, inhibiendo su crecimiento. Los investigadores realizaron una zanja de 0,92 m de profundidad alrededor de una parcela de estos árboles, cortando 825 raíces, y suprimiendo así su capacidad para competir por los recursos disponibles. El experimento se desarrolló durante 8 años y los resultados fueron tan espectaculares como en el caso de los peces de la barrera de coral. La vegetación que se estableció en las parcelas en donde la competencia de las raíces de los pinos se había eliminado, era diez veces superior que en las parcelas control. Aparentemente las raíces de pino ejercían una competencia interespecífica por el agua y los nutrientes que suprimía el crecimiento de otras plantas. Además se observó también cierto grado de competencia intraespecífica, ya que en la parcela control existía una menor regeneración natural de *P. strobus* en comparación con las parcelas en donde la masa radical había sido reducida (Tourney & Kienholz 1931; Molles 2002).

#### 1.1.5. Depredación y parasitismo

La depredación es un tipo de interacción en donde el depredador obtiene biomasa a expensas de la presa. Aunque el ejemplo más común de depredación es el de los carnívoros, el término en realidad incluye a todas esas interacciones en las cuales un organismo se alimenta de otro, independientemente de su nivel trófico (carnívoro o herbívoro) y de lo estrecha que sea la interacción (parásito o parasitoide).

La herbivoría en ocasiones puede tener una connotación muy positiva si es parte del mecanismo del control biológico, en donde un organismo invasor es controlado en su expansión por un enemigo natural (Heard & Winterton 2000; Hoddle 2004). Un claro ejemplo de este fenómeno es el caso del cactus *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. (Cactaceae), nativa de México, Norteamérica y Cuba, que fue introducida en Australia como planta ornamental aproximadamente en 1850. Poco a poco este cactus se fue expandiendo y se estableció en las zonas naturales en donde encontraba las condiciones idóneas para crecer y reproducirse. Alrededor de 1930, la planta ya ocupaba unos 24 millones de hectáreas. Los investigadores se dieron cuenta de que esta espectacular expansión era debida a la ausencia de enemigos naturales de esta planta. Después de una larga búsqueda, se encontró que uno de los enemigos naturales más efectivos era la mariposa *Cactoblastis cactorum* Berg.

(Lepidoptera, Pyralidae). De hecho, las hembras de esta especie primero introducen sus huevos en el interior del cactus, y luego las larvas forman galerías en su interior, introduciendo a su vez hongos y bacterias patógenos que atacan a los tejidos vegetales. Los investigadores introdujeron a este enemigo natural en Australia y comprobaron que el control biológico era contundente: en dos años la población de cactus se redujo de 12.000 individuos por hectárea a tan sólo 27 (Fig. 1).



**Figura 1.** Área colonizada por *Opuntia stricta* antes (a) y después (b) de la introducción de la mariposa *Cactoblastis cactorum* (Molles 2002).

El parasitismo es considerado como una forma particular de depredación, en donde el parásito consigue beneficios de la relación íntima con su hospedador, que es mantenido con vida durante un largo tiempo. Un curioso ejemplo de parasitismo es el que se observa todos los años en las Montañas Rocosas, situadas en el sector occidental de Norteamérica, en donde además de muchas coloridas flores salvajes, existe una brillante flor amarilla cuyo crecimiento es alterado cuando es infectada por un hongo patógeno (Fig. 2). El hongo es *Puccinia monoica* Arthur (Basidiomycota, Pucciniaceae) y sus hospedadores son plantas del género *Arabis* (Brassicaceae). Estas plantas pasan meses o incluso años en forma de roseta basal y durante este tiempo invierten mucho en desarrollar raíces en donde almacenan recursos. Al terminar esta fase, crecen rápidamente y florecen. Una vez polinizadas, las plantas forman semillas que maduran y completan el ciclo. Sin embargo, cuando el hongo ataca a las plantas en el estado de roseta basal, estimula a las hojas para que produzcan pseudoflores muy parecidas en color, tamaño y forma a las flores verdaderas (Fig. 2). Las falsas flores producen una fragancia dulce que atrae a los polinizadores y además exudan una solución rica en fructosa muy apreciada por estos. Este sistema favorece la reproducción sexual del hongo, a través de los insectos que buscan alimento siguiendo señales visuales y olfatorias, pero normalmente provoca la muerte de la planta.



**Figura 2.** Efectos del hongo *Puccinia monoica* en la morfología de las plantas del género *Arabis*. Desarrollo normal de la planta (a). Pseudoflor desarrollada por la infección del hongo (b). Las pseudoflores son atractivas para una amplia variedad de insectos polinizadores (c) (Molles 2002).

En los años ochenta se realizó un interesante estudio sobre la interacción entre parásitos y hospedadores (Moore 1984). Las especies implicadas fueron el gusano endoparásito, *Plagiorhynchus cylindraceus* Goeze (Acantocephala, Plagiorhynchidae), la cochinilla de la humedad *Armadillium vulgare* Latreille (Crustacea, Isopoda) y el estornino pinto, *Sturnus vulgaris* L. (Passeriformes, Sturnidae). Se demostró que los adultos del gusano ponen huevos en el intestino de los estorninos, que son expulsados luego al exterior a través las heces. El isópodo al ingerir las heces infectadas propicia el desarrollo de los huevos y la formación de larvas maduras en aproximadamente 60 días. Estas larvas alteran el comportamiento de los isópodos, ya que los individuos infectados abandonan las zonas protegidas y se trasladan a zonas abiertas donde son vulnerables a la depredación por parte de los estorninos. Los isópodos ingeridos por los estorninos liberan los acantocéfalos en el intestino, cerrando así el ciclo vital del parásito.

Dentro de la categoría de los parásitos se encuentran los parasitoides, que merecen sin duda una mención a parte debido a la complejidad de su biología y ecología. El término “parasitoide” fue acuñado en 1913 por O. Reuter para indicar una categoría de insectos cuyas larvas se desarrollan alimentándose de un hospedador. Desde el punto de vista ecológico, los parasitoides son considerados una categoría intermedia entre los depredadores y los parásitos, ya que como los primeros siempre matan a sus presas, aunque en conformidad con los segundos establecen una relación íntima con un solo hospedador, que necesitan para completar su desarrollo. Las principales características de los parasitoides podrían resumirse de la siguiente manera: 1) el desarrollo del parasitoide siempre determina la destrucción y muerte de su hospedador, 2) sólo el estadio larvario

necesita al hospedador, siendo el adulto totalmente libre, y 3) en la mayoría de los casos el parasitoide y el hospedador proceden del mismo taxón (Santolamazza-Carbone 2007). Un ejemplo de parasitoide es el himenóptero oófago *Anaphes nitens* Girault (Hymenoptera, Mymaridae), agente controlador del gorgojo del eucalipto, *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera, Curculionidae). Este curculiónido es originario de Australia y se alimenta de hojas y brotes de *Eucalyptus* spp. ocasionando daños de importancia tanto en sus cuatros estadios larvarios como en la fase adulta. En Galicia se detectó por primera vez su presencia en 1991 en Lourizán (Pontevedra), donde probablemente llegó a través de la importación de madera de Sudamérica (Mansilla 1992). Para combatir a este curculiónido, y siguiendo la experiencia de otros países (Tooke 1955), se ha desarrollado un programa de control biológico utilizando el parasitoide *A. nitens*, que gracias a su excelente capacidad para detectar puestas frescas de su hospedador, ha proporcionado rápidamente óptimos resultados (Cordero Rivera et al. 1999; Santolamazza-Carbone et al. 2004).

#### 1.1.6. Mutualismo

Una interacción mutualista es aquella en la que dos especies incrementan su supervivencia, crecimiento o reproducción como resultado de su coexistencia. Esta relación se puede denominar mutualismo simbiótico o protocooperación en función del grado de obligatoriedad de la misma. Mientras que el mutualismo implica una relación obligatoria, en el sentido de que los dos organismos están obligados a vivir en contacto, la protocooperación se refiere a un tipo de relación facultativa.

La protocooperación se presenta en la mayoría de los casos de propagación de semillas y de polinización por parte de vertebrados. Es una interacción que produce beneficios tanto a los animales, que obtienen alimento, como a las plantas, porque permite el cruzamiento, dispersión y propagación de las especies. Sin embargo, en este caso no se puede hablar de relación obligatoria, ya que los animales tienen otras fuentes de alimento y las plantas otros agentes de polinización y de dispersión. Un ejemplo de este tipo de relación es la que se establece entre la planta *Corema album* (L.) D. Don. (Empetraceae), endémica de la costa oeste de la península ibérica y conocida con el nombre de “camariña”, y algunos vertebrados. Las semillas de esta especie son dispersadas por varias especies de pájaros, principalmente por aves frugívoras como mirlos (*Turdus merula* L.), por las gaviotas (*Larus cachinnans* Pallas), y también por mamíferos como los conejos (*Oryctolagus cuniculus* L.). Estudios de campo han demostrado que las gaviotas son los mejores dispersores y que la

probabilidad de germinación de las semillas se eleva en este caso hasta el 17,59%. Los frugívoros por lo tanto parecen ser muy importantes para la germinación de las semillas de *C. album*, no tanto por sus efectos directos, sino por su habilidad para transportar semillas a lugares óptimos para su crecimiento (Calviño-Cancela 2004).

En el mutualismo simbiótico, los individuos interactúan físicamente y su relación es estrecha y obligatoria. Llevando esta relación a sus extremas consecuencias, los dos organismos implicados funcionan como si fueran uno solo, tal y como ocurre para los líquenes, en donde el hongo proporciona la estructura macroscópica y el alga aporta los nutrientes a través de la fotosíntesis. A pesar de su abundancia y diversidad ( $\pm 15.000$  especies en el mundo,  $\pm 3.000$  en España y  $\pm 900$  en Galicia), los líquenes continúan siendo organismos poco conocidos (Pérez et al. 2003). Por otra parte, también los hongos micorrízicos que se instalan en las raíces de las plantas, establecen una relación mutualista muy íntima con el organismo vegetal hospedador que le proporciona hidratos de carbono (Allen 1991; Smith & Read 1997; Read & Pérez-Moreno 2003). Las micorrizas son particularmente importantes en los suelos pobres en nutrientes, ya que facilitan la descomposición de la hojarasca y la captación de agua, nitrógeno y fósforo (Harley & Smith 1983; Molina et al. 1992; Allen et al. 1995). Estos hongos producen además sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, reducen la susceptibilidad de sus hospedadores a los patógenos del suelo y estimulan a las raíces a producir sustancias químicas antibióticas (Ingham & Molina 1991; Smith & Read 1997; Bogeat-Triboulot et al. 2004). Sin las micorrizas, la mayoría de las plantas terrestres no podrían crecer y sobrevivir adecuadamente (Koljalg et al. 2000; Taylor & Alexander 2005; De Román et al. 2005).

#### 1.1.7. Mutualismo influenciado por otros organismos.

Desde hace varias décadas los estudios ecológicos se han centrado en las interacciones entre dos niveles tróficos, y en particular en las interacciones planta-herbívoro y depredador-presa (Tscharnkte & Hawkins 2002). En realidad, para obtener una visión más realista del funcionamiento de los ecosistemas, es importante estudiar relaciones más complejas que incluyan tres o más niveles de la cadena trófica (Price et al. 1980; Barbosa et al. 1990; Hatcher 1995; Gange & Brown 1997; Pace et al. 1999; Tscharnkte & Hawkins 2002). En los textos de ecología general se define el mutualismo como una asociación entre organismos de dos especies en las cuales ambas resultan beneficiadas (McNaughton & Wolf 1984). Sin embargo, la influencia de terceras especies u otros niveles tróficos en este

tipo de relación curiosamente ha recibido poca atención (Olf et al. 1999; Tschardtke & Hawkins 2002).

Bronstein & Barbosa (2002) realizaron una interesante revisión sobre distintos tipos de mutualismo, ilustrando con claridad la verdadera complejidad de estas interacciones, y explicando como a menudo otros organismos, con distintos papeles ecológicos, contribuyen a su mantenimiento, modulando la intensidad y dirección de la interacción. En este tipo de relación a tres, la pareja de especies que interactúa puede ser definida como mutualista sólo en el contexto de una asociación con otro organismo. En ausencia de este, la interacción beneficiosa no se produciría o podría convertirse en antagonismo. Algunos ejemplos interesantes de la complejidad del mutualismo se detallan a continuación.

#### 1.1.7.1. Mutualismo mantenido por un enemigo natural de una de las partes

Este tipo de relación se podría definir como “mutualismo de protección”, ya que una de las dos especies repele a los depredadores, parásitos o parasitoides de la especie *partner*. Muchas especies de hormigas defienden con tenacidad a determinadas plantas de sus enemigos naturales, como homópteros y orugas, a cambio de recibir alimento en forma de exudados de alto contenido energético (Pierce 1987; Huxley & Cutler 1991; Koptur 1992). Un ejemplo de esta interacción son las plantas de la familia Melastomataceae, muy abundantes en el trópico y de la que se conocen al menos 13 géneros que cuentan con especies mirmecófilas (Jolivet 1996). Concretamente, se demostró que en *Maieta guianensis* Aubl. la presencia de las hormigas reducía la herbivoría y permitía un incremento del 45% de la producción de frutos en comparación con las plantas que crecían en ausencia de hormigas (Vasconcelos 1991). Sin embargo, la larva de la mariposa *Jalmenus evagoras* Schmett (Lepidoptera, Lycaenidae) que se alimenta en árboles de acacia, prefieren desarrollarse en plantas que hospedan hormigas (Pierce et al. 1987). De hecho, se demostró que la tasa de depredación y parasitismo que las larvas de mariposa sufren en ausencia de hormigas es tan alta que estas no podían sobrevivir.

#### 1.1.7.2. Mutualismo mantenido por un competidor de una de las partes

Uno de los casos mejor documentados de este tipo de interacción múltiple es el que ve como protagonistas el coral *Oculina arbuscula* Verril (Anthozoa, Oculinidae) y el cangrejo omnívoro *Mithrax forceps* A. Milne-Edwards (Crustacea, Majidae) que viven en la costa de Carolina del Norte (EEUU). El cangrejo se refugia en las zonas donde están los corales y a

su vez se alimenta de pequeños invertebrados que crecen sobre ellos o en las inmediaciones. Se demostró que en los arrecifes en donde los cangrejos habían sido eliminados artificialmente, se desarrollaba una densa cobertura de organismos epibiontes. Esta situación provocaba una reducción del crecimiento del coral y un incremento de la mortalidad, en comparación con los arrecifes donde los cangrejos no habían sido retirados (Stachowicz & Hay 1999).

En otros casos el mutualista puede reducir los efectos de la competencia sobre su pareja. Es lo que ocurre a las plantas del género *Andropogon* (Liliopsida, Poaceae) que predominan en las praderas sólo cuando se encuentran en asociación con ciertas micorrizas que les aportan recursos (Hartnett et al. 1993; Kula et al. 2005). Estos hongos pueden conferir a la planta resistencia a los enemigos naturales, evitando la competencia que las desplazaría (Clay et al. 1993).

#### 1.1.7.3. Mutualismo alterado por antagonistas de una de las partes

Los enemigos naturales (antagonistas) no sólo reducen el éxito reproductor de su presa, sino que indirectamente influyen también en el éxito reproductor del organismo mutualista que está relacionado con esta. Como ya se ha mencionado anteriormente, muchas especies de plantas han evolucionado en conjunto con algunos insectos, estableciendo una asociación mutualista defensiva. Este es el caso de la hormiga *Pheidole bicornis* Forel (Hymenoptera, Formicidae) y las plantas del género *Piper* (Piperaceae). Sin embargo, la araña *Diplocephalus banksii* (Araneae, Theridiidae), depredadora de hormigas, interfiere en este mutualismo. La araña contruye una tela en la base de las hojas jóvenes de estas plantas, pero las hormigas las evitan porque son capaces de detectarlas. Se demostró que las plantas con arañas presentaban más daños por herbivoría que las plantas privadas de ellas, debido a que las hormigas no las defendían (Gastreich 1999).

Otro ejemplo de este fenómeno está representado por el cangrejo ermitaño *Pagurus longicarpus* Say (Crustacea, Paguridae), que vive en las costas de Massachusetts (EEUU), y que lleva a menudo encima de su concha a hidrozoo del género *Hydractinia* (Cnidaria, Hydractiniidae) (Fig. 3). En determinadas condiciones, esta interacción es claramente mutualista ya que por un lado los cangrejos transportan a los hidrozoo a sitios óptimos para su alimentación y por el otro los hidrozoo evitan que organismos dañinos para el cangrejo se instalen sobre su concha. Sin embargo, este mutualismo se puede ver alterado por otras especies. En determinadas ocasiones la *Hydractinia* se asocia con poliquetos que

debilitan la concha del cangrejo ermitaño y lo hacen más vulnerable a ciertos depredadores como el cangrejo azul, *Callinectes sapidus* Rathbun (Crustacea, Portunidae). Como consecuencia, el tipo de interacción que se establece entre el cangrejo ermitaño y los hidrozoos variará entre mutualismo, comensalismo o antagonismo en función de la presencia de otras especies (Buckley & Ebersole 1994).



**Figura 3.** Colonia de *Hydractinia* sp. sobre un cangrejo ermitaño (Picton & Morrow 2005).

#### 1.1.7.4. Mutualismo alterado por mutualistas de una de las partes

Este tipo de relación se define en inglés “*friend’s friend interactions*” que podría traducirse como las “interacciones entre los amigos de mis amigos” (Fig. 4). Esto es lo que ocurre para determinadas especies de plantas, que florecen todas a la vez atrayendo a un elevado número de polinizadores y facilitando así el éxito reproductor de todas ellas (Lavery 1992). Otro ejemplo lo proporcionan ciertas plantas que al compartir simbiontes radiculares comparten también los beneficios del transporte de nutrientes (Whitfield 2007). Simard et al.



(1997) utilizaron plántulas micorrizadas de *Betula papyrifera* Marsh y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco., a las cuales habían suministrado los marcadores radiactivos  $^{14}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ , para demostrar que existía un movimiento bidireccional de carbono entre las dos especies, con un claro beneficio para ambas. Después de 9 días, el 4% de los isótopos de carbono aportados a cada planta estaban en las hojas de la otra. Este experimento demostró claramente los beneficios que otorgan las complejas redes de hongos micorrícicos asociados a las raíces.

**Figura 4.** Una visión muy romántica de las relaciones mutualistas que existen entre plantas (Whitfield 2007).



#### 1.1.7.5. Mutualismo alterado por especies que explotan el mutualismo

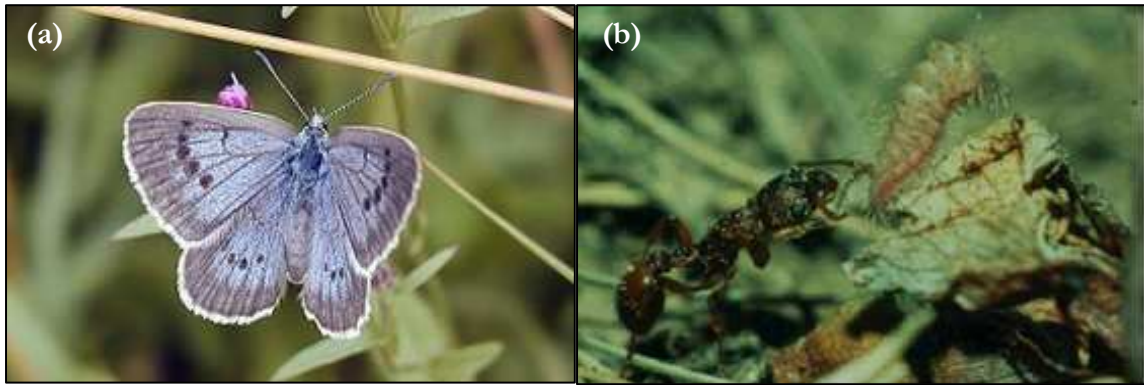
En este caso, algunos organismos que se aprovechan de la relación mutualista de otros, obtienen beneficios sin suministrar ninguna ventaja a cambio. Es lo que ocurre a las orquídeas del género *Orchis*, que producen flores sin néctar que atraen a los machos de algunas especies de abejas simulando ser sus hembras. Los machos acuden a las flores para aparearse y viendo frustrados sus intentos, vuelan insatisfechos a otras flores transportando así el polen (Dafni 1984).

#### 1.1.7.6. Mutualismo alterado por causas antropogénicas

Los efectos antropogénicos sobre los ecosistemas naturales pueden ser altamente perjudiciales y se están incrementando de una forma alarmante en las últimas décadas (Smith & Buddemeier 1992; Buchmann & Nabham 1996; Kearns et al. 1998; Richardson et al. 2000). Entre los efectos indirectos, cabe destacar la introducción intencionada o accidental de depredadores, parásitos o competidores de las especies autóctonas que mantienen una relación mutualista con otro organismo. Este es el caso de la invasión de la hormiga argentina *Linepithema humile* (Bond & Slingsby 1984), que ha provocado importantes alteraciones en numerosas relaciones mutualistas en todos los continentes en los que está presente (Krushelnycky & Gillespie 2008). En Sudáfrica por ejemplo, esta hormiga compite con las hormigas autóctonas y determina una reducción significativa de la dispersión de semillas de plantas endémicas con dispersión mirmecocórica (Bond & Slingsby 1984). En Hawái, su efecto negativo ha llegado al extremo de provocar la destrucción de nidos de abejas endémicas esenciales para la polinización de la flora local (Cole et al. 1992).

Otro caso interesante es el de la gran mariposa azul, *Maculinea arion* L. (Lepidoptera, Lycaenidae) (Fig. 5). En 1979 se declaró “extinta” en el Reino Unido y, pese a que siempre había sido escasa, los investigadores se sorprendieron de su desaparición y decidieron estudiar su ciclo de vida en otros países para tratar de aclarar el misterio. Fue así como lograron descubrir que durante los 10 meses de su etapa de oruga, el insecto vive dentro de un nido de hormigas rojas, haciendo creer a sus anfitrionas que es una de sus larvas. La mariposa deposita sus huevos sobre las hojas de una especie de tomillo, el *Thymus polytrichus* A. Kerner ex Borbás subsp. *britannicus* (Ronn.) Kerguelen (Lamiaceae), y después de eclosionar, las pequeñas larvas se alimentan de las hojas de la planta. Al cabo de tres semanas, se dejan caer al suelo en donde permanecen hasta ser encontradas por las

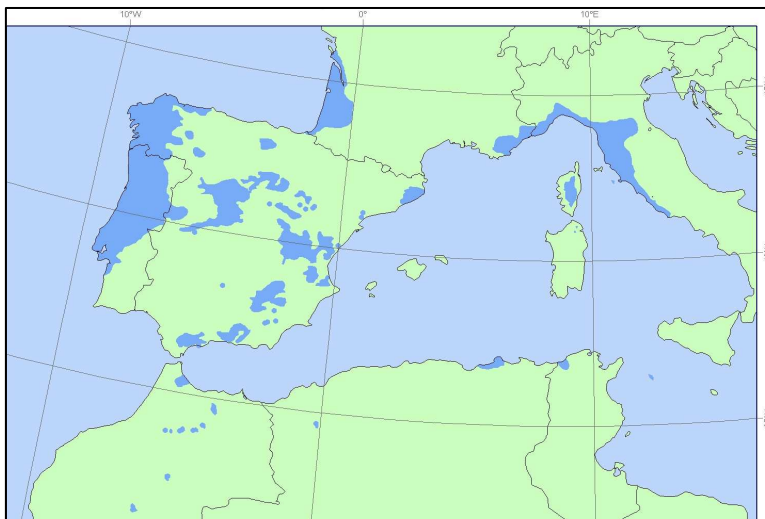
hormigas. Cuando ocurre el encuentro, la hormiga utiliza sus antenas para palpar la larva y ese contacto provoca que la larva libere una feromona que confunde a la hormiga haciéndole creer que se trata de la larva de otra coespecífica. Al mismo tiempo, la larva libera una sustancia azucarada que es muy apreciada por las hormigas y que las induce a llevar la larva al hormiguero. Una vez allí, la oruga comienza a alimentarse de las larvas de las hormigas, y en esta situación permanece durante unos 10 meses. Entre mayo y junio la oruga se convierte en una hermosa mariposa de color azul (Fig. 5a). Después de reunir esta información los expertos estudiaron los hábitats en los que vivía la mariposa en el Reino Unido. Encontraron que muchas de las áreas habían sido convertidas por el hombre en tierras de cultivo o se encontraban ocupadas por edificaciones. Sin embargo, todavía existían suficientes espacios silvestres en los que la mariposa podía sobrevivir. De hecho, la planta de tomillo aún abundaba y todavía podían observarse muchos nidos de hormigas rojas. La causa de la extinción de la mariposa seguía siendo un misterio. Sin embargo, el entomólogo Jeremy Thomas descubrió que el ciclo de vida de la *Maculinea* era aún más complicado de lo que se creía. En primer lugar, las orugas eran cuidadas por un solo tipo de hormiga roja, la *Myrmica sabuleti* Meinert (Hymenoptera, Formicidae) (Fig. 5b), que había desaparecido de todos los sitios investigados. Esta hormiga sólo construye sus hormigueros en las laderas expuestas al sur, lo que asegura que el nido reciba suficiente calor. Aún así, si el pasto que crece en esas laderas es demasiado alto, el sol no llega a calentar el nido y las hormigas mueren. Durante cientos de años el ganado y los conejos habían pastado en las áreas donde las hormigas hacían sus nidos, lo que aseguraba que las hierbas no crecieran demasiado. Sin embargo en la zona, ahora convertida en terrenos agrícolas, prácticamente no existía ganado, y los conejos habían sido atacados por una epidemia de mixomatosis que había provocado una gran mortandad. Esta situación llevó a la extinción a la hormiga *M. sabuleti*. Otras especies de hormigas rojas, más resistentes al frío, habían colonizado la zona, pero esas hormigas no le daban protección a las larvas de la gran mariposa azul, de modo que ésta se vio condenada a la extinción (Thomas 1976; Thomas 1980).



**Figura 5.** Adulto de *Maculinea arion* (a). *Myrmica sabuleti* transportando una larva de *Maculinea arion* (b) (Imágenes de Jeremy Thomas, <http://www.macman-project.de/WPs3.htm>).

## 1.2. Interacciones ecológicas en el ecosistema de *Pinus pinaster* Ait.

El pino marítimo, *Pinus pinaster* Ait., es una conífera natural de la región mediterránea occidental y de la fachada atlántica. A nivel mundial la superficie ocupada por esta conífera se estima en torno a los 4,4 millones de hectáreas, de las cuales 4,2 millones se encuentran en el área de distribución natural de esta especie (España, Portugal, Francia, Marruecos, Italia, Turquía, Grecia y Túnez) (Fig. 6) y las otras 200.000 hectáreas se sitúan en otras áreas donde esta conífera ha sido introducida y utilizada para reforestación (Australia, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Chile, Argentina y Uruguay) (Rauscent 1999).



**Figura 6.** Mapa del área natural de distribución de *Pinus pinaster* (Alia & Martin 2003).

En Galicia es el pino que ocupa la mayor superficie forestal (390.000 ha), siendo también el árbol más utilizado para repoblaciones (Ministerio Medio Ambiente 2006). Dentro de esta especie se distinguen dos subespecies: la atlántica, que ocupa el norte de Portugal, noroeste

de España y suroeste de Francia, y la mediterránea, que se extiende por el resto del área de distribución.

En la comunidad gallega, donde *P. pinaster* se conoce comúnmente como “piñeiro do país”, “piñeiro bravo” o “pino femia”, es probablemente una especie autóctona, aunque en el pasado era poco frecuente y estaba asociada sobre todo a los arenales costeros. La gran expansión de su área de distribución se debe principalmente a la acción del hombre, que utilizó este árbol en repoblaciones desde el siglo XVIII. En el siglo XIX, el pino marítimo se extendía por toda la costa de Galicia y por el occidente asturiano, siempre en cotas bajas. Ya en el siglo XX las administraciones públicas, gracias a los programas de repoblación, aumentaron considerablemente la superficie ocupada por esta especie (Gutián 1996). Si se comparan los datos proporcionados por los inventarios forestales, la superficie ocupada por *P. pinaster* ha pasado de 621.000 ha existentes en 1972 a 470.000 ha en 1986 (Rodríguez Soalleiro et al. 1997), reduciéndose ulteriormente a 390.000 ha en 2006 (Ministerio Medio Ambiente 2006). Esta reducción en los últimos años se debe principalmente a la sustitución del pino por el eucalipto, preferido en la costa por su rápido crecimiento, por la producción de celulosa de alta calidad y por la fácil regeneración después de los incendios. El pino marítimo es un árbol enormemente frugal que crece sobre suelos muy someros, arenosos y poco fértiles. Además es resistente al frío, por lo que aparece en altitudes limitantes (500-800 m) donde otros árboles, como el eucalipto, no pueden desarrollarse (Rodríguez Soalleiro et al. 1997).

En las masas de *P. pinaster* una multitud de organismos establecen su nicho ecológico (Fig. 7) (Rodríguez Soalleiro et al. 1997). Uno de los organismos más problemáticos es el lepidóptero defoliador *Thaumetopoea pityocampa* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera, Thaumetopoeidae), también conocido como procesionaria del pino. Se trata de un lepidóptero nocturno de costumbres gregarias distribuido por el sur de Europa y particularmente activo en la cuenca del Mediterráneo (Devkota & Schmidt 1990). Los síntomas característicos de su presencia son los pre-nidos construidos por las larvas durante el verano y el otoño con seda, ligeros todavía y poco voluminosos, y los bolsones o nidos de invierno, que la larva del tercer estadio forma en las ramas (Fig. 8). La defoliación es producida por las orugas que se alimentan de las acículas. Más de 500.000 hectáreas quedan completamente defoliadas todos los años en España a causa de este insecto (Montoya et al. 2002). La defoliación provoca en el pino una reducción del crecimiento y reproducción. Cuando la población de procesionaria es muy abundante las acículas son

eliminadas casi totalmente y en algunos casos el daño provoca la muerte del árbol (Dajoz 2000; Hódar et al. 2003).



**Figura 7.** Insectos (negro), hongos (rojo) y nemátodos (azul) que establecen una relación trófica con *Pinus pinaster*.

Los hongos del género *Lophodermium* (Fig. 9a), sobre todo *L. pinastri* (Schrad.) Chevall., *L. seditiosum* Minter, Staley & Millar. y *L. conigenum* (Brunaud) Hilitzer, así como sus formas imperfectas *Leptostroma pinastri* Desm. y *L. pinorum* Sacc. provocan enrojecimientos de las acículas (rojos criptogámicos) y desarrollo de fructificaciones características en forma de grano de café de 1 mm de longitud. Otros hongos encontrados frecuentemente sobre las acículas son *Pestalotia funerea* Desm., *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton y *Botrytis*

*cinerea* Pers., que provocan marchitez de las hojas y disminución del crecimiento de la planta (Fig. 9b).



**Figura 8.** Bolsón elaborado sobre un pino marítimo por las larvas de procesionaria en su fase gregaria para protegerse de las inclemencias meteorológicas.

Los insectos chupadores de savia como la cochinilla *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera, Matsucoccidae) también utilizan el pino marítimo como planta hospedadora. Las lesiones más graves son producidas por las larvas del primer y segundo estadio, que con sus picaduras debilitan al árbol y pueden llegar a producir su muerte (Romanyk & Cadahia 1992).



**Figura 9.** Daños producidos por *Lophodermium* sp. (a) y *Sphaeropsis sapinea* (b) en *Pinus pinaster*.

Entre los insectos que colonizan el tronco predominan los xilófagos perforadores (Lombardero 1995), como los escolítidos *Ips sexdentatus* Boern. y *Tomicus piniperda* L. (Coleoptera, Scolytidae) o los curculiónidos *Hylobius abietis* L. y *Pissodes castaneus* Degeer.

(Coleoptera, Curculionidae). Los xilófagos pueden producir dos tipos de daños en los pinares: uno menos importante realizado por los adultos durante su alimentación y el principal realizado por las larvas, que excavan sus galerías y se alimentan en el floema. Se ha demostrado que el ataque de *Hylobius abietis* provoca un aumento de los canales resiníferos en el xilema de *P. pinaster*, como medida de defensa contra el insecto (Moreira et al. 2008). En la Tabla 2 aparece un listado de los coleópteros xilófagos capturados en 2008 sobre plantas adultas de *P. pinaster* después de un incendio (Santolamazza-Carbone S., no publicado).

Taxón	Nº
<i>Tomicus piniperda</i>	174
<i>Ips sexdentatus</i>	129
<i>Pissodes castaneus</i>	72
<i>Hylurgus ligniperda</i>	62
Buprestidae	50
<i>Sirex juvencus</i>	26
Cerambycidae	24
<i>Hylastes ater</i>	23
<i>Anobium punctatus</i>	23
<i>Xyleborus</i> sp.	21
Elateridae	21
<i>Pityogenes calcaratus</i>	18
<i>Hylastes angustatus</i>	8
<i>Orthotomicus</i> sp.	1

**Tabla 2.** Coleópteros xilófagos capturados en 2008 sobre plantas adultas de *P. pinaster* después de un incendio (Santolamazza-Carbone S., no publicado).

Entre los organismos que colonizan las raíces de *P. pinaster* destacan principalmente los hongos patógenos, entre los cuales se encuentra *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., ampliamente distribuida en Galicia (Rodríguez Soalleiro et al. 1997). Este hongo ataca a árboles jóvenes cuando el sistema radicular presenta alguna herida, o bien a árboles estresados por sequías persistentes, frío, asfixia radicular, excesiva humedad del suelo o compactación, ataque de insectos defoliadores o replantación sobre suelos infectados. Su propagación se efectúa por rizomorfos o por contacto entre raíces de árboles enfermos y sanos (Fox 2000). Otro hongo que aparece frecuentemente asociado a *P. pinaster* es *Leptographium serpens* (Goid.) M.J. Wingf. (Ascomycota), que provoca el azulado de la madera y la pérdida de crecimiento. Este patógeno suele aparecer como consecuencia de las quemaduras de los restos de podas en los montes, ya que el fuego de las hogueras daña las raíces de *P. pinaster* y elimina hongos antagonistas de *L. serpens*, tal y como *Trichoderma viride* Pers.. Debido al rápido crecimiento de *L. serpens* y a la lenta recuperación de *T. viride*, el hongo patógeno coloniza fácilmente las raíces dañadas por el fuego (Fernández de Ana Magán 1982). También es habitual que los escolítidos se asocien con hongos que provocan

el azulado de la madera, estableciendo una relación mutualista que afecta negativamente al árbol hospedador (Six 2003).



**Figura 10.** *Lactarius deliciosus* (a), *Boletus pinicola* (b), *Tricholoma portentosum* (c), *Boletus edulis* (d), *Cantharellus cibarius* (e).

Las raíces del pino marítimo son colonizadas también por hongos ectomicorrícicos estableciéndose una relación de simbiosis de la que dependen ambos organismos. El papel de las micorrizas es fundamental en los ecosistemas forestales, tanto para el hongo como para la planta hospedadora porque el hongo recibe los hidratos de carbono producto de la fotosíntesis del pino mientras que la planta recibe principalmente fósforo y nitrógeno



(Smith & Read 1997). El pinar de pino marítimo es uno de los ecosistemas forestales de mayor interés para el aprovechamiento de las setas que producen los hongos micorrícicos (Fig. 10). Las especies de mayor consumo e interés económico son *Boletus aereus*, *B. edulis*, *B. pinicola*, *Cantharellus cibarius* y *Lactarius deliciosus*. Los aprovechamientos micológicos también aportan un beneficio de carácter social, ya que las personas aficionadas a la micología valoran y fomentan la conservación del monte y de sus recursos (Rodríguez Soalleiro et al. 1997; Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000).



**2. CAPÍTULO II: INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS DEFOLIADORES Y HONGOS SIMBIONTES EN PLANTAS DE *PINUS PINASTER* AIT.**

---





## 2.1. Introducción

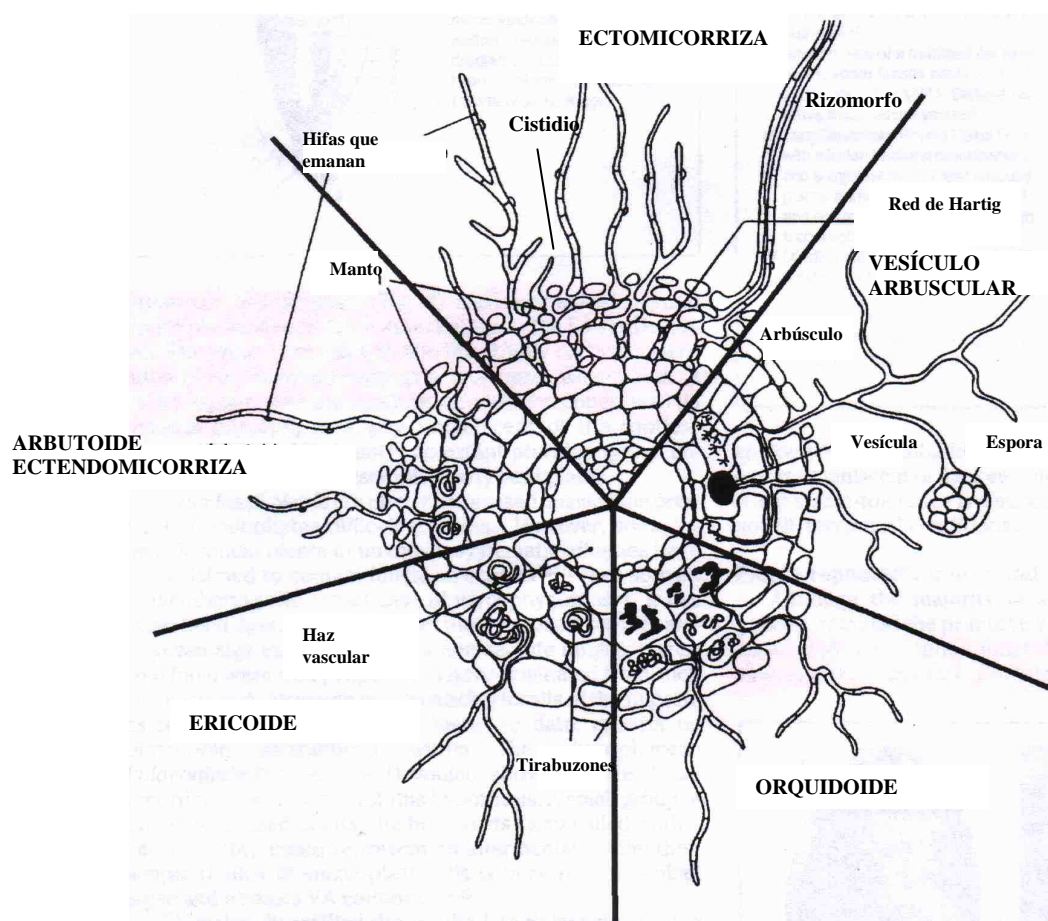
### 2.1.1. Los hongos micorrícicos

El botánico alemán Albert Bernhard Frank, en 1885, fue el primero en utilizar el término micorriza, del griego *mykes* (hongo) y *rhiza* (raíz), para describir la estructura y el funcionamiento de la relación simbiótica que se establece entre un hongo y la raíz de una planta superior (Trappe 2005). El científico postuló que esta simbiosis era mutualista, puesto que ambos seres parecían beneficiarse de tal asociación (Allen 1991). La simbiosis micorrícica ha evolucionado como un mecanismo de supervivencia para las plantas y los hongos permitiendo a ambos establecerse y sobrevivir en condiciones extremas, provocadas por ejemplo por suelos pobres en nutrientes, altas temperaturas o intensos periodos de sequía (Harley & Smith 1983; Molina et al. 1992). A pesar de que en realidad la relación micorrícica se mueve a lo largo de un *continuum* que va desde el parasitismo al mutualismo, generalmente esta simbiosis es considerada como un ejemplo clásico de mutualismo (Johnson et al. 1997).

La simbiosis micorrícica afecta principalmente al intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedadora (Read & Pérez-Moreno 2003). Los hongos que establecen esta relación reciben los hidratos de carbono producto de la fotosíntesis de la planta hospedadora, mientras que la planta obtiene principalmente fósforo y nitrógeno, gracias a la compleja red de hifas fúngicas que los captan del suelo. Las micorrizas incrementan la absorción del agua, contribuyen a la agregación y estabilización de las partículas del suelo, aumentan la resistencia de la planta ante condiciones de estrés biótico y/o abiótico (salinidad, herbivoría, patógenos radiculares, metales pesados) y establecen conexiones entre las raíces de los árboles cercanos favoreciendo así el intercambio de nutrientes (Ingham & Molina 1991; Smith & Read 1997; Bogeat-Triboulot et al. 2004)

En 1973, el investigador David H. Lewis fue el primero en describir el intercambio bidireccional que se establece entre ambos organismos (Lewis 1973). El científico además dividió las micorrizas en dos grandes grupos: las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Dentro de esta última categoría diferenció tres tipos: vesículo-arbusculares, ericáceas y orquidáceas.

Actualmente se reconocen siete tipos de micorrizas en función de su morfología, anatomía y ecología (Smith & Read 1997): las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) o endomicorrizas propiamente dichas, las ectomicorrizas (ECM), las ectendomicorrizas, las micorrizas arbutoides, las monotropoides, las ericoideas y las orquidoides (Fig. 11). En la Tabla 3 aparecen resumidas las principales características de cada tipo de micorriza que brevemente se describen a continuación.



**Figura 11.** Anatomía de los distintos tipos de micorrizas en un corte transversal de la raíz (adaptada de Selosse & Le Tacon 1998).

Micorrizas vesículo-arbusculares (VA) o endomicorrizas

Son las más comunes y se forman gracias a la asociación de los hongos del orden Glomales (Glomeromycota) con las raíces de gimnospermas, angiospermas, briófitos y pteridófitos. También fueron las primeras en aparecer, ya que se han encontrado esporas de estos organismos en estratos de hasta 400 millones de años de antigüedad (Pirozynski & Dalpe 1989), y son las únicas formadas por hongos aseptados (Smith & Read 1997). Los hongos

que las forman se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical sin formar un manto externo que se pueda detectar a simple vista. Por esta razón para encontrarlas es necesario proceder a la tinción del tejido radical, ya que no inducen ningún cambio morfológico externo en la raíz de la planta. Las hifas inicialmente se introducen en los espacios intercelulares, y luego penetran en el interior de las células formando vesículas y arbuscúlos (Fig. 11). Los arbuscúlos son estructuras muy ramificadas en donde se produce el intercambio de nutrientes entre los dos simbios. Las vesículas son esporas redondeadas de pared engrosada, que en realidad no aparecen en todas las endomicorrizas.

### Ectomicorrizas (ECM)

El término ectomicorriza fue propuesto en 1969 por el botánico Bruno Peyronel (Peyronel et al. 1969). Las ECM están formadas en mayor parte por hongos Basidiomycota, en menor medida por hongos Ascomycota, y excepcionalmente por hongos Glomeromycota. El micelio del hongo rodea la raíz formando un manto fúngico externo, mientras que las hifas se ramifican repetidamente por los espacios intercelulares formando la red de Hartig (Fig. 11). La red de Hartig es la zona en donde se produce el intercambio de nutrientes. En las Angiospermas, las hifas del hongo reducen su penetración a la epidermis de la planta, mientras que en las gimnospermas llegan hasta las células corticales, extendiéndose en ocasiones incluso hasta la endodermis (Smith & Read 1997). Es frecuente la aparición de otros elementos característicos como las hifas, los rizomorfos, formados por agregados lineares de hifas, y los cistidios, que son células especializadas con múltiples formas que aparecen sobre el manto (Agerer 2006; Nakamori & Suzuki 2007). Desde el punto de vista de la planta, las raíces sufren evidentes cambios morfológicos, reduciendo su crecimiento en longitud y experimentando una intensa y abundante ramificación (Smith & Read 1997). La estructura del manto externo varía según la edad del hongo, el tipo de hospedador, el tipo de suelo, aunque es bastante característico para cada género (Agerer, 2001). El micelio puede ser muy laxo, como en el caso de los géneros *Russula* y *Lactarius*, o muy compacto con grandes cordones de hifas (rizomorfos) que se extienden a larga distancia, como en los géneros *Suillus* y *Scleroderma*. La importancia de las ECM se fundamenta no sólo en su interés forestal, en consideración del tipo de planta que las forman, sino también en el interés económico de los hongos que intervienen (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000).

### Ectendomicorrizas

Se forman principalmente en los géneros *Pinus* y *Larix*. En un principio, los hongos que las constituyen se clasificaron como E-strain (Mikola 1965), aunque después gracias a la utilización de las técnicas moleculares, se ha comprobado que pertenecen a un reducido número de hongos Ascomycota: *Sphaerosporella brunnea*, *Phialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum* y especies del género *Wilcoxina* (Menkis 2004). Al igual que las ECM, presentan un manto externo fino que envuelve la raíz y una red de Hartig bien desarrollada, aunque a diferencia de estas, sus hifas también penetran dentro de las células de la planta formando tirabuzones (Fig. 11).

### Micorrizas arbutoides

Se trata de micorrizas formadas por las plantas del orden Ericales, concretamente los géneros *Arbutus* y *Arctostaphylos*, y por algunos géneros de la subfamilia Pyrolae. Los hongos que las forman son principalmente *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Thelephora terrestris* o *Cenococcum geophilum*, que en realidad suelen formar también ECM si se asocian con otros géneros vegetales. Al principio fueron consideradas un tipo de ectendomicorrizas, pero luego se ha demostrado que presentan algunas peculiaridades en su estructura, suficientes para considerarlas un tipo distinto (Peterson et al. 2004). De hecho al igual que las ectendomicorrizas, las hifas de las arbutoides forman un manto externo alrededor de la raíz, una red de Hartig y tirabuzones en el interior de las células del cortex radical (Fig. 11). Sin embargo a diferencia de estas, tanto la red de Hartig como los tirabuzones se limitan a la epidermis de la raíz y no penetran en la endodermis.

### Monotropoides

Este tipo de micorriza se forma en las plantas del orden Ericales pertenecientes a la familia Monotropoidaceae, cuya característica principal es la ausencia de clorofila. Los hongos que las mantienen son Basidiomycota de los géneros *Tricholoma*, *Hydnellum*, *Russula* y *Rhizopogon*, y generalmente pueden formar también ECM con otras familias de plantas (Cullings et al. 1996). Tienen una estructura parecida a las ECM ya que presentan la red de Hartig y un manto externo que puede llegar a ser muy grueso. Sin embargo, las monotropoides presentan una característica única: unas cortas hifas, que se originan en la red de Hartig o en el manto, con forma de haustorios que penetran en las células de la epidermis radical (Fig. 11). Estas estructuras altamente especializadas intervienen en el desarrollo y floración



de la planta hospedadora. De hecho, la familia Monotropoidaceae depende de los hongos micorrícicos para la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. Estas plantas se definen por lo tanto micoheterotróficas, ya que sus hongos micorrícicos establecen una conexión con las raíces de árboles cercanos que realizan la fotosíntesis y, a través de las hifas, obtienen el carbono necesario para su crecimiento (Peterson et al 2004).

### Ericoides

Este tipo de micorriza se forma entre los hongos Ascomycota y las plantas del orden Ericales, concretamente de las familias Ericaceae (excepto *Arctostaphylos* y *Arbutus*), Empetraceae y Epacridaceae. Estos hongos desarrollan hifas intracelulares pero no presentan ni manto externo ni red de Hartig (Fig. 11). La mayoría de las plantas hospedadoras crecen en suelos en donde la mayoría de nutrientes están presentes en forma orgánica y por eso no disponibles para ellas sin la ayuda de los hongos (Smith and Read 2008).

### Orquidooides

Esta relación simbiótica se establece entre los hongos Basidiomycota del género *Rhizoctonia*, y plantas de la familia Orchidaceae, que carecen de clorofila al menos en algún momento de su desarrollo. Hay evidencias de la existencia de un flujo bidireccional de carbono entre ambos organismos, ya que resultados recientes sugieren que el C y el N derivados de aminoácidos pueden ser asimilados por los hongos micorrícicos y transferidos a la planta (Cameron et al. 2006). Estas micorrizas no forman ni manto ni red de Hartig, aunque desarrollan tirabuzones dentro de las células del córtex radical (Fig. 11).

Las micorrizas tienen una gran importancia para el funcionamiento y el mantenimiento de la biodiversidad vegetal de los ecosistemas de las regiones boreales y templadas (Grime et al. 1987; Allen 1991; van der Heijden et al. 1998) y tropicales (Pérez-Moreno & Ferrera-Cerrato 1997; Moyersoen et al. 1998a; Moyersoen et al. 1998b; Newbery et al. 2000; Moyersoen et al. 2001). En la actualidad se estima que el 85% de las plantas vasculares son dependientes de las micorrizas (Kirk et al. 2001). Sin embargo, aunque esta asociación simbiótica se ha estudiado durante varias décadas, debido a la complejidad del reino Fungi, estamos todavía lejos de conocerla a fondo. Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre las comunidades de los hongos micorrícicos han sido principalmente descriptivos y existen pocos experimentos sobre la interacción de estos simbiontes con organismos de otros

niveles tróficos que se hospedan en la misma planta (Taylor & Alexander 2005). Es necesario un estudio más intenso sobre los mecanismos de esta simbiosis para poder entender las consecuencias ecológicas que la caracterizan (Whitfield 2007).

**Tabla 3.** Características de los diferentes tipos de micorrizas (Smith & Read 1997).

	VA	ECM	Ectendo	Arbutoides	Monotropoides	Ericoides	Orquidáceas
<b>Hongos septados</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>Hongos aseptados</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>Aclorofilas</b>	+/-	-	-	-	+	-	+
<b>Colonización intracelular</b>	+	-	+	+	+	+	+
<b>Manto</b>	-	+	+/-	+/-	+	-	-
<b>Red de Hartig</b>	-	+	+	+	+	-	-
<b>Tirabuzones</b>	+	-	+	+	-	+	+
<b>Vesículas</b>	+/-	-	-	-	-	-	-
<b>Hongos simbiosntes</b>	Glomero	Basidio Asco (Glomero)	Basidio Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
<b>Plantas simbiosntes</b>	Bryo Pterido Gimno Angio	Gimno Angio	Gimno Angio	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryo	Orchidales

Leyenda: VAM (micorrizas vesículo- arbusculares), ECM (ectomicorrizas), Ectendo (ectendomicorrizas), Glomero (Glomeromycota), Basidio (Basidiomycota), Asco (Ascomycota), Bryo (Bryophyta), Pterido (Pteridophyta), Gimno (Gymnospermas), Angio (Angiospermas).

Se ha demostrado que las micorrizas influyen en el intercambio de nitrógeno y fósforo (Arnebrant et al. 1993; Wallenda et al. 2000; Read & Pérez-Moreno 2003), en la distribución de carbono en la planta (Simard et al. 1997; Saikkonen et al. 1999; Nehls & Hampp 2000) y en la captación de agua (Querejeta et al. 2003; Plamboeck et al. 2007). Además incrementan la tolerancia a la sequía (Ingham & Molina 1991; Swaty et al. 2004), a la salinidad (Diouf et al. 2005) y a los metales pesados (Jentschke & Godbold 2000) y proporcionan protección frente a los patógenos del suelo (Ingham & Molina 1991). Su producción de biomasa es excepcional: se ha estimado que 1 m de raíz colonizada por hongos ectomicorrícicos puede estar asociado con hasta 8 km de micelio fúngico (Smith & Read 1997), y que en 3 m<sup>2</sup> de suelo forestal puede existir suficiente micelio fúngico para dar una vuelta entera a la Tierra por el Ecuador (Leake et al. 2004).

### 2.1.2. Ecología de las ectomicorizas

La riqueza de especies y la diversidad taxonómica de los simbiontes ectomicorrícicos es enorme, lo que delata su importancia en los ecosistemas terrestres (Smith & Read 1997; Leake 2001; De Román et al. 2005). Se conocen aproximadamente entre 6.000 y 10.000 especies de hongos ectomicorrícicos asociados a 8000 especies de plantas (Taylor & Alexander 2005; Agerer 2006). Su papel es fundamental en los ecosistemas forestales, ya que las plantas hospedadoras, pertenecientes a las familias *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae* y *Salicaceae*, revisten un gran interés ecológico y económico (Smith & Read 1997). Una revisión bibliográfica de las publicaciones producidas desde 1922 hasta 2006 sobre los hongos ectomicorrícicos asociados a *P. pinaster* (Anexo I), ha puesto de manifiesto la existencia de 40 géneros y 199 especies de macromicetos asociados a una sola especie de planta hospedadora (Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009).

Cuando se establece la asociación entre las raíces de una planta hospedadora y un hongo ectomicorrícico, se produce un cambio morfológico muy evidente en la raíz de la planta, ya que los ápices radiculares reducen su crecimiento en longitud y se ramifican en abundancia. Un claro ejemplo de este fenómeno son los hongos ectomicorrícicos de los géneros *Suillus* y *Rhizopogon*, que desarrollan en el suelo grandes cantidades de ápices micorrizados, formando un manto fúngico muy denso (Agerer 1999). Además, diferentes tipos de plantas pueden compartir el mismo hongo ectomicorrícico y estar conectadas entre ellas, creando un flujo bidireccional de carbono, tal y como se ha demostrado para *Betula papyrifera* y *Pseudotsuga menziesii* utilizando isótopos radioactivos (Simard et al. 2002).

Muchos estudios ecológicos se han basado exclusivamente en el muestreo de las fructificaciones (setas o carpóforos), asumiendo que su producción reflejaba la abundancia relativa de cada especie y la composición de las comunidades fúngicas asociadas a las raíces (Jumpponen et al. 1999; Richard et al. 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006). Sin embargo, se ha estimado que aproximadamente sólo un 20-30% de la comunidad de micorizas produce fructificaciones (Dahlberg 2001). Esto significa que los muestreos de setas proporcionan una información incompleta, ya que especies fúngicas que son abundantes en forma de fructificaciones no lo son a nivel de los ápices radicales y viceversa (Jonsson et al. 1999). Investigaciones llevadas a cabo en Norte América y Europa, han confirmado esta situación demostrando que los hongos dominantes en una comunidad ectomicorrícica asociada a coníferas pertenecen principalmente al phylum Ascomycota y a

las familias Corticiaceae y Thelephoraceae (Basidiomycota), que no suelen producir estructuras reproductoras conspicuas, y que por lo que no son detectados en los muestreos de fructificaciones (Gardes & Bruns 1996; Gehring et al. 1998).

En la actualidad, el número de especies de ECM identificadas, sea en el phylum Ascomycota (Tedersoo et al. 2006) que en el Basidiomycota (Koljalg et al. 2000), se está incrementando constantemente debido a la aplicación de los métodos moleculares (Horton & Bruns 2001). Se ha demostrado además que hay árboles capaces de establecer simultáneamente asociaciones con distintos tipos de micorrizas. Los miembros de los géneros *Populus* y *Alnus* por ejemplo, son capaces de formar a la vez micorrizas VA y ECM en la misma raíz (Lodge 1989; Cervantes & Rodríguez-Barrueco 1992). En caso de colonización mixta, durante el crecimiento de la planta la sucesión de especies fúngicas pasa por una mayor presencia inicial de micorrizas VA, y luego procede con un progresivo aumento de ECM (Chen et al. 2000).

La adquisición de nutrientes por parte de los árboles se produce principalmente a través de los hongos ectomicorrícicos, gracias a la capacidad de sus micelios de colonizar todas las regiones del suelo ricas en nutrientes (Bücking et al. 2002; Taylor & Peterson 2005). De hecho se ha demostrado que la absorción a través de las hifas es más eficiente que en las raíces sin colonización, debido al volumen del micelio, que se desarrolla más allá de la zona cubierta por las raíces (Yanai et al. 1995; Simard et al. 2002). Además, a través de su arsenal de enzimas, las ECM explotan formas orgánicas de nitrógeno y fósforo que serían inaccesibles de otra manera para la planta hospedadora (Read & Pérez-Moreno 2003). El ácido oxálico que secretan las hifas de las ECM puede movilizar nutrientes inorgánicos como fósforo, potasio, calcio y magnesio a través de la erosión mineral (Landeweert et al. 2001). Sin embargo esta habilidad para movilizar nutrientes orgánicos e inorgánicos varía en función de las especies de ECM, lo cual significa que no todas las micorrizas aportan los mismos beneficios a la planta.

La actividad de las ECM depende de la actividad fotosintética de la planta hospedadora, y es consabido que estos hongos actúan como sumideros de carbono, generando una retroalimentación positiva para la adquisición de carbono por parte del hospedador (Högberg et al. 2008). En realidad, la dinámica de la asignación del carbono orgánico en la simbiosis ectomicorrícica depende de 1) la intensidad de la actividad fotosintética de la planta hospedadora, 2) la disponibilidad de nutrientes, 3) las especies fúngicas que

participan y 4) la intensidad del intercambio de nutrientes entre los dos simbiontes. De hecho, pequeños cambios en las condiciones de luz que afectan a la planta hospedadora se traducen en una reducción del crecimiento y de la respiración de los hongos (Heinemeyer et al. 2007). Para prevenir que el mutualismo se convierta en parasitismo, la planta hospedadora puede regular el flujo de carbohidratos que asigna a los hongos micorrícicos que colonizan sus raíces (Johnson et al. 1997).

El carbono fijado es transportado desde el hospedador hasta los tejidos del hongo en forma de ácidos orgánicos y azúcares solubles, como la sacarosa, que no puede ser utilizada directamente por las ECM (Salzer & Hager 1991; Nehls et al. 2007). Por consiguiente, la sacarosa primero debe ser hidrolizada por la invertasa ácida, localizada en el apoplasto de las células vegetales. Todo el proceso se lleva a cabo en el espacio que hay entre las células del hongo y las células de la planta, es decir en la red de Hartig (Salzer & Hager 1991). La regulación de la actividad de la invertasa ácida se convierte entonces en la principal herramienta que la planta utiliza para controlar el flujo de carbono hacia las ECM (Nehls & Hampp 2000; Wright et al. 2000). Una elevada concentración de monosacáridos en el apoplasto estimula el transporte de carbono hacia el hongo, aumentando la actividad de las ECM como sumidero de carbono (Hampp et al. 1999). Además, se ha demostrado que algunos genes implicados en el transporte de monosacáridos influyen la simbiosis ectomicorrícica, de manera que la planta hospedadora puede en algunos casos competir con el hongo por los carbohidratos (Grunze et al. 2004). Esta competencia se puede producir en caso de que el consumo de carbono supere los beneficios nutricionales que aporta el hongo simbionte. También la longevidad de las raíces finas está muy relacionada con la disponibilidad de nutrientes en el suelo, especialmente el nitrógeno, lo que implica que la asignación de carbono a las raíces continúa mientras los hongos aporten beneficios nutricionales (Burton et al. 2000). Esto significa que, en teoría, el hospedador podría dejar de alimentar de manera selectiva a esos ápices micorrizados en donde el coste de carbono cedido supere a los beneficios obtenidos en forma de nutrientes minerales (Hoeksema & Kummel 2003).

El consumo de carbono por parte de las ECM varía según la especie y también dentro de la misma especie en función de su actividad. La biomasa fúngica es una medida importante para estimar el coste de carbono que le supone a la planta hospedadora mantener la simbiosis. Estudios de laboratorio han demostrado que las ECM que presentan un mayor desarrollo del micelio externo, y requieren más carbono que los hongos que producen un

micelio más laxo y por lo tanto una biomasa fúngica reducida (Colpaert et al. 1992; Gorissen & Kuyper 2000). Muchas ECM son capaces de producir enzimas extracelulares para explotar los nutrientes presentes en forma orgánica (Read & Pérez-Moreno 2003), necesitando así un mayor aporte de energía por parte del hospedador. Por ejemplo, miembros de los géneros *Lactarius* y *Russula* muestran una elevada actividad enzimática, lo que supone un gran coste de carbono, pero en cambio producen poco micelio externo (Agerer 2001). Además, el consumo de carbono de las ECM se ve afectado por su respiración, que varía a nivel intra- e inter-específico, mostrando además una variación en el tiempo en función de la asimilación de nutrientes (Bidartondo et al. 2001; Fransson et al. 2007). La cantidad de carbono asignada a las ECM depende también de la edad de la raíz. De hecho, se ha demostrado que la planta reduce la asignación de carbono a los ápices micorrícicos senescentes (Durall et al. 1994). En realidad los hongos ectomicorrícicos prolongan la vida de las raíces finas, y de hecho mantienen su actividad de sumideros de carbono durante un largo periodo de tiempo (Pregitzer 2002).

### 2.1.3. El análisis molecular para la identificación de las ectomicorrizas

El método morfológico para la identificación de las ECM se basa en la descripción de las principales características anatómicas y morfológicas de estos organismos, llegando a la determinación de un “morfotipo” (Last et al. 1979; Agerer 1987-2002; Ingleby et al. 1990; Agerer 1991). Extraer una micorriza directamente de la raíz de la planta permite además establecer con seguridad su rango de hospedadores, a diferencia de lo que ocurre con los carpóforos, para los cuales es difícil establecer con exactitud la identidad del árbol asociado (Agerer 1987-2002; Massicotte et al. 1999). El sistema de descripción morfológico más utilizado para la identificación de ECM es el descrito por Agerer (Agerer 1987-2002). Según este sistema, las características más importantes son la estructura del manto y los elementos que emanan, como por ejemplo los rizomorfos, las hifas y los cistidios. Otras características como el color o el tipo de ramificación, tienen menos peso en este sistema de clasificación en consideración de su gran variabilidad (Agerer 1999; Agerer 2006). De todas formas, este método presenta muchas limitaciones, ya que 1) el número de hongos sin identificar es todavía muy alto (Nylund et al. 1995), 2) la morfología de una especie determinada puede variar en función de su edad, del tipo de suelo o de la planta hospedadora (Egger 1995) y, 3) existen micorrizas que presentan una morfología muy parecida a pesar de pertenecer a taxones diferentes y viceversa (Egger 1995; Wurzburger et al. 2001; Menkis et al. 2005; Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009).

La aplicación de los métodos moleculares ha representado sin duda un enorme avance en el estudio de las comunidades de micorrizas (Gardes & Bruns 1993; Egger 1995; Gehring et al. 1998; Horton & Bruns 2001; Sakakibara et al. 2002; Horton 2002; Bruns & Shefferson 2004). Estos métodos permiten extraer ADN a partir de pocos miligramos de las estructuras vegetativas (ápices micorrícicos) que, como ya se ha dicho antes, son muy difíciles de identificar utilizando únicamente la caracterización morfológica. La aplicación de los métodos moleculares ha demostrado que los hongos micorrícicos que predominan en forma de carpóforos no son necesariamente los que predominan en forma de ápices micorrizados, y que el número de especies identificadas se incrementa de manera significativa cuando se combinan los datos de los muestreos de carpóforos con los resultados del análisis de ADN de los ápices micorrícicos (Gardes & Bruns 1996; Gehring et al. 1998; Jonsson et al. 1999; Koljalg et al. 2000; Wurzburger et al. 2001; Dahlberg 2001; Horton & Bruns 2001; Tedersoo et al. 2003; Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009). Jonsson et al. (1999) encontraron que las especies de ECM que fructifican son menos del 30% del número total de ECM que se asocian a las raíces de *Pinus sylvestris*. Esto es debido principalmente al hecho de que especies pertenecientes a las familias Thelephoraceae o Corticeaceae, generalmente muy abundantes, no forman fructificaciones conspicuas (Gardes & Bruns 1996; Dahlberg et al. 1997; Kåren & Nylund 1997).

El primer paso para la identificación molecular de un hongo es la extracción de ADN y su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) (White et al. 1990; Gardes & Bruns 1993). Esta técnica consiste en la síntesis *in vitro* de ADN gracias a la acción catalizadora de la enzima Taq ADN Polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988), y al principio de complementariedad de las bases del ADN (Mullis & Faloona 1987). La PCR permite obtener un elevado número de copias de fragmentos específicos de ADN, partiendo incluso de una única copia inicial de ADN molde. Los componentes principales de la reacción de PCR son: 1) la enzima Taq ADN Polimerasa, que cataliza la reacción de duplicación, 2) los cebadores (*primers*), fragmentos sintéticos de ADN monocatenario compuestos por 18-25 nucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean las regiones del ADN a amplificar, 3) el tampón de amplificación (MgCl<sub>2</sub>), que crea un medio químico adecuado para el correcto funcionamiento de la enzima y 4) los desoxirribonucleótidos (dNTPs) que son las bases necesarias para sintetizar las nuevas cadenas de ADN a partir de la secuencia molde.

La PCR consiste básicamente en la repetición de ciclos de temperatura con el fin de favorecer la actividad de la ADN polimerasa, para obtener una cantidad de ADN suficiente para su detección mediante electroforésis. La técnica consta de tres pasos fundamentales que se llevan a cabo en un termociclador. La primera etapa es la desnaturalización del ADN molde, que se obtiene aplicando durante unos minutos una temperatura de 95°C para provocar la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y separar las dos hebras del ADN molde. La segunda etapa se desarrolla a una temperatura de 30-40°C, y prevé la hibridación o anillamiento de los cebadores a las secuencias 3'→5' que flanquean los fragmentos diana que serán duplicados. La tercera etapa, que se realiza a 72°C durante unos minutos, prevé la elongación de los fragmentos diana por acción de la ADN polimerasa, que agrega los nucleótidos complementarios a la secuencia. Estas tres fases se repiten durante 40-45 ciclos, utilizando como molde en cada ciclo el ADN obtenido en el ciclo anterior. Como resultado de la amplificación se generan millones de copias del ADN molde, cuyo tamaño y concentración se pueden determinar mediante electroforesis en gel de agarosa (Peay et al. 2008).

Con los productos de la PCR se realiza luego una secuenciación directa (*direct sequencing*) que permite determinar la sucesión exacta de los nucleótidos que componen el ADN problema. La secuencia resultante, con una longitud entre 500 y 700 pares de bases, se compara con las secuencias almacenadas en las bases de datos internacionales de libre acceso, como por ejemplo GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), disponible online a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sin embargo, esta base de datos presenta algunas limitaciones, ya que algunas secuencias puede ser de mala calidad o contener errores (Peay et al. 2008). Debido a este problema, se están creando bases de datos específicas de ADN de micorrizas, como UNITE (Koljalg et al. 2005) y FESIN (The Fungal Environmental Sampling and Informatics Network) (Bruns et al. 2008), que utilizan principalmente secuencias introducidas por expertos en la materia, por lo que su fiabilidad y calidad es mucho mayor (Peay et al. 2008).

Actualmente se está poniendo a punto otra técnica de secuenciación que prevé la clonación previa de los fragmentos de ADN problema (Peay et al. 2008). Al igual que en la secuenciación directa, el ADN es primero extraído y luego amplificado mediante PCR. Sucesivamente, los productos de la PCR son examinados mediante electroforesis y los fragmentos del tamaño molecular correspondiente a las especies que se quiere identificar, son seleccionados. Estos fragmentos son insertados en un vector de clonación,

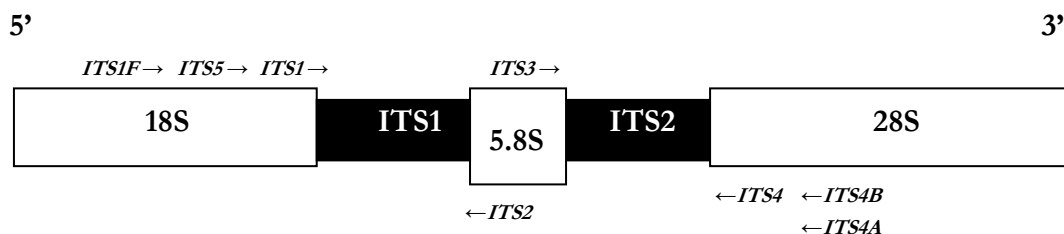


introducidos en células bacterianas, como por ejemplo *Escherichia coli*, y cultivados. Se seleccionan luego las células que contienen el ADN problema utilizando un medio de cultivo con antibióticos, como la ampicilina, hacia el cual el vector es resistente. En alternativa, las colonias de las células clonadas son seleccionadas en función del color, ya que al contener el vector se produce la alteración de la lectura del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Las colonias de las células son amplificadas finalmente mediante PCR, y seleccionadas mediante electroforesis. Los fragmentos del tamaño adecuado ( $\sim 700$ pb), son luego purificados y secuenciados para su identificación taxonómica. Estudios recientes han demostrado que la clonación permite identificar más especies que la secuenciación directa, sobre todo en ápices radicales de gran tamaño que pueden estar colonizados por varias especies de ECM (Lindner & Banik 2009). Tal característica hace que este método sea el más apropiado para la identificación de ECM a partir de muestras de suelo (Landeweert et al. 2003). Analizando directamente los micelios del suelo se reduce notablemente el tiempo necesario para la manipulación, selección y limpieza de las muestras (Landeweert et al. 2003; Renker et al. 2006; Smith et al. 2007). Se ha demostrado además que la riqueza de especies de ECM presentes en el suelo es mayor que a nivel de las raíces (Landeweert et al. 2005). Sin embargo, este método no permite asegurar de que planta hospedadora proviene el micelio.

El estudio de las secuencias de ADN ribosómico (ADNr) ha proporcionado mucha información para la identificación de las micorrizas (Horton & Bruns 2001). El ADNr está muy conservado y aparece repetido múltiples veces en el genoma de los organismos. Comprende entre otras, las regiones codificantes del gen de la subunidad pequeña (18S), el gen 5.8S, el gen de la subunidad grande (28S) y las regiones no codificantes denominadas ITS (Internal Transcribed Spacer) (Fig. 12). Estas regiones tienen un elevado polimorfismo interespecífico que les convierte en herramientas útiles para estudios filogenéticos, mientras que varían muy poco dentro de la misma especie (Gardes & Bruns 1993; Egger 1995; Gehring et al. 1998; Horton & Bruns 2001; Sakakibara et al. 2002).

Los ITS están formados por 600-900 pares de bases, incluyendo el gen 5.8S, y pueden ser fácilmente amplificados utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS4, diseñados para amplificar secuencias de ADN de muchos organismos (White et al. 1990; Gardes et al. 1991), los cebadores específicos para hongos (ITS1F e ITS4), los cebadores específicos para Basidiomycetes (ITS1F e ITS4B) (Gardes & Bruns 1993; Cullings et al. 1996; Kären et

al. 1997) y los cebadores específicos para Ascomycetes (ITS5 e ITS4A) (Larena et al. 1999) (Tabla 4).



**Figura 12.** Fragmento de ADN<sub>r</sub> donde se observan las regiones codificantes del gen de la subunidad pequeña (18S), el gen 5.8S, el gen de la subunidad grande (28S) y las regiones variables ITS. En cursiva aparecen los principales cebadores y su sitio de unión con la secuencia de ADN.

Sin embargo, los ITS presentan una limitación, ya que no tienen suficiente variabilidad intraespecífica para diferenciar entre individuos de la misma especie o entre especies muy cercanas entre sí (Gardes & Bruns 1993; Cullings et al. 1996; Kåren et al. 1997).

**Tabla 4.** Secuencias de los principales cebadores utilizados para amplificar ADN de ECM.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4	TCCTCCGCTTATIGATATGC
ITS4A	CGCCGTTACTGGGGCAATCCCT
ITS4B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Otra técnica utilizada para el estudio de las micorrizas, es el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Kåren et al. 1997), que se basa en el principio según el cual distintos organismos llevan los sitios de restricción en diferentes puntos de la cadena de ADN. Por consiguiente, las secuencias de restricción de organismos pertenecientes al mismo taxón o a diferentes

taxones, presentarán distintos patrones de distancia, longitud y disposición en el ADN, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción. El análisis se lleva a cabo utilizando enzimas de restricción (endonucleasas) que cortan los productos amplificados por PCR en los correspondientes sitios de restricción. Los fragmentos digeridos por las enzimas son posteriormente separados mediante electroforesis y los patrones de bandas obtenidos son comparados con una base de datos, normalmente obtenida a partir de muestras de carpóforos (Kåren & Nylund 1997). Los resultados se utilizan también para construir árboles filogenéticos que permiten ubicar taxonómicamente la especie problema junto a las demás especies ya conocidas (Koljalg et al. 2000). Sin embargo, esta técnica es menos precisa respecto a la secuenciación directa y presenta varias limitaciones, ya que las bases de datos se crean a partir de los carpóforos y algunas especies de ECM no llegan a producirlos o los producen en formas de costras (resupinatos), poco conspicuos y difíciles de observar (Horton 2002; Avis et al. 2006).

#### 2.1.4. Interacción entre las micorrizas, los herbívoros y las plantas

En ecología forestal las investigaciones se han centrado principalmente en las poblaciones de organismos que viven en la parte aérea de las plantas, ya que estos son más fáciles de observar, muestrear y manipular experimentalmente que las comunidades de organismos que viven en el subsuelo. Como consecuencia, existen menos estudios que analicen las relaciones que se establecen entre los organismos que viven por encima y por debajo del suelo (van der Putten et al. 2001), aunque sí existen muchos trabajos que analizan por separado sus efectos sobre las plantas (Gehring & Whitham 2002). En particular, las interacciones entre los hongos micorrícicos y otros niveles tróficos han recibido poca atención, probablemente debido a la gran dificultad de estudiar relaciones tan complejas (Gehring & Whitham 2002; Smith & Read 2008).

La simbiosis micorrícica afecta no sólo a la planta en la cual se establece, si no que también influye sobre la productividad y el ciclo de nutrientes del suelo y sobre la estructura y diversidad de la comunidad de los organismos asociados a la planta, como por ejemplo los insectos herbívoros, los parasitoides, los agentes de dispersión de semillas y los polinizadores (Price 1997; Smith & Read 2008).

#### 2.1.4.1. Efecto de los herbívoros sobre los hongos micorrícicos

Investigaciones recientes han demostrado que los hongos micorrícicos y los insectos interactúan entre ellos de una forma muy compleja (Gehring & Bennett 2009). En concreto, se ha demostrado que los insectos pueden influir sobre los hongos ectomicorrícicos consumiendo hifas fúngicas (micofagia), dispersando propágulos de esporas, y consumiendo los tejidos fotosintéticos de la planta hospedadora (Smith & Read 2008).

Los herbívoros defoliadores provocan en la planta una pérdida de tejidos fotosintéticos, lo que genera una disminución de la capacidad de producción de hidratos de carbono, afectando a la capacidad de la planta hospedadora para mantener su asociación mutualista con las micorrizas (Wallace 1981; Gehring & Whitham 1991; Gehring & Whitham 2002; Wardle et al. 2004). Estos resultados son consistentes con estudios que demostraron como el porcentaje de colonización de las micorrizas se reduce si la actividad fotosintética de la planta disminuye, por ejemplo a causa de la sombra (Andersen & Rygielwicz 1991). En otros casos se ha comprobado como eliminando los herbívoros aumenta proporcionalmente la colonización de las raíces por parte de hongos micorrícicos (Gehring & Whitham 1991; Del Vecchio et al. 1993; Gehring & Whitham 2002). Saikkonen et al (1999), basándose en esta idea, establecieron que la limitación fotosintética se traduce en un cambio en las especies de ECM asociadas, disminuyendo las especies que necesitan más carbono y que producen mucha biomasa fúngica, y aumentando las especies pioneras más frugales. Las micorrizas con baja demanda en carbono representan un gasto menor para la planta hospedadora y son más fáciles de conservar ante una situación de estrés en donde la producción de carbono está limitada (Saikkonen et al. 1999; Markkola et al. 2004; Saravesi et al. 2008). Es importante destacar que las micorrizas VA consumen entre un 10 y un 50% (Simard et al. 2002) de la producción total de carbohidratos, mientras que las ECM el 10-20% (Jakobsen et al. 2002).

Los primeros estudios de revisión que se realizaron sobre la interacción entre la herbivoría y la colonización de los hongos micorrícicos en las familias Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Solanaceae, Betulaceae y Pinaceae (Gehring & Whitham 1994), encontraron que la reducción de la parte aérea de la planta disminuía el porcentaje de colonización en 23 de las 37 plantas estudiadas, mientras que en 10 de ellas no se observó ningún efecto. Además se registró un efecto positivo en dos casos: en plantas de las praderas de Serengeti (*Panicum*

*coloratum*) (Wallace 1981) y en plantas de soja (*Glycine max*) (Bayne et al. 1984). Posteriormente se analizó el efecto de la herbivoría sobre 4 especies de plantas que forman ECM y 1 que forma micorrizas VA, encontrando que la colonización micorrícica se reducía después de la defoliación en todos los casos excepto para *Pinus sylvestris* (Markkola 1996; Rossow et al. 1997; Gange & Bower 1997; Kolb et al. 1999). Gange y Bower (1997) encontraron que la defoliación provocada por la oruga del lepidóptero *Arctia caja* reducía la colonización de micorrizas VA en especies herbáceas como *Plantago lanceolata*. En el primer estudio que analizó el efecto de la herbivoría ocasionada por vertebrados sobre las colonización de ECM, Rossow et al. (1997) encontraron que la defoliación producida por alces y liebres reducía la colonización ectomicorrícica en *Populus balsamifera* y *Salix* sp. Por otra parte, en otros trabajos en donde se aplicó una defoliación artificial a plantas de *Pinus sylvestris* (Markkola 1996; Saikkonen et al. 1999; Kuikka et al. 2003; Saravesi et al. 2008) y *Betula pubescens* (Markkola et al. 2004), no se observó ningún efecto sobre la colonización de ECM. El mismo resultado se obtuvo esta vez con una defoliación natural producida por *Lymantria dispar* sobre *Populus canadensis* (Kosola et al. 2004). En la Tabla 5 aparece una revisión de los artículos publicados desde 1991 hasta 2008, que analizan el efecto de la herbivoría sobre la comunidad de ECM.

La herbivoría tiene efectos positivos (Gange et al. 2002a; Wamberg et al. 2003) o negativos (Wamberg et al. 2003; Kula et al. 2005; Mueller et al. 2005; Currie et al. 2006) también sobre la colonización radicular de las micorrizas VA. De hecho, estudios más detallados han demostrado que aunque la herbivoría no produzca a corto plazo una reducción de la colonización de estas micorrizas, puede determinar cambios en el número de arbusculos, que son las estructuras que intervienen en el intercambio de nutrientes entre los hongos y la planta (Wearn & Gange 2007). La variabilidad de la respuesta de las micorrizas VA a la herbivoría está relacionada generalmente con la edad de la planta (Wamberg et al. 2003) y con el grado de defoliación aplicado (Gange et al. 2002a). Recientemente ha sido documentado el efecto positivo de la herbivoría producida por el ácaro *Tetranychus urticae* sobre la colonización de la micorriza VA *Gigaspora margarita* en plantas de *Lotus japonicus*, en donde la colonización micorrícica aumentó hasta un 24% después de la herbivoría con respecto al control (Nishida et al. 2009).

Otro aspecto poco analizado es la influencia de los herbívoros sobre la riqueza y la diversidad de la comunidad de ECM. También en este caso los resultados disponibles en la literatura son contradictorios. El primer estudio que analizó el efecto de la herbivoría sobre

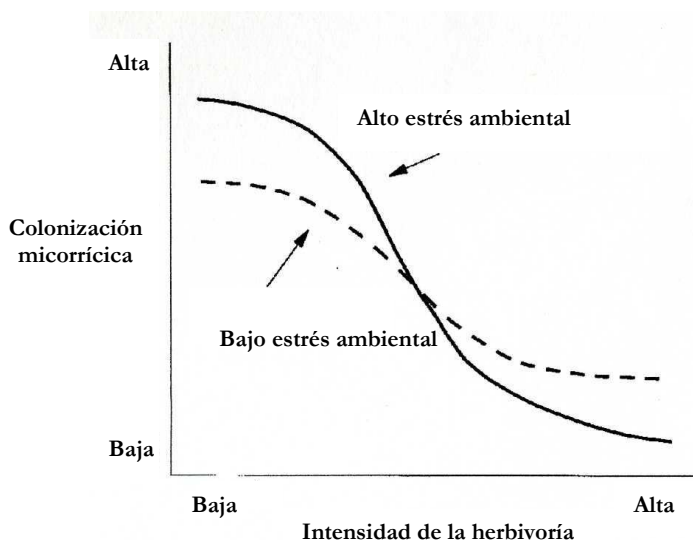
la diversidad de especies fúngicas, encontró que había más especies de micorrizas VA en las parcelas en donde no se había producido herbivoría de ungulados durante los últimos 19 años, que en las parcelas donde las plantas habían sido comidas (Bethlenfalvay & Dakessian 1984). Resultados similares se obtuvieron en *Pinus edulis*, para el cual un ataque crónico de la cochinilla defoliadora *Matsucoccus acalyptus* se tradujo en cambios de la estructura de la comunidad de ECM asociada a las plantas más susceptibles al ataque del insecto (Gehring & Whitham 2002). Por otra parte, Saikkonen et al. (1999) detectaron un cambio en la abundancia relativa de las especies después de la defoliación manual de *P. sylvestris*, aunque no observó ninguna variación en el porcentaje de colonización de las raíces. En concreto, en 3 de los 7 morfotipos encontrados, la abundancia relativa se redujo después de la defoliación. Sin embargo, los 7 morfotipos aparecieron en todos los tratamientos, indicando que la defoliación no afectó a la riqueza de especies. Resultados similares se obtuvieron con la defoliación de *P. contorta*, que no provocó ningún efecto sobre la riqueza de especies de ECM (Cullings et al. 2005).

En cuanto a la abundancia de carpóforos, también se ha observado una reducción de la diversidad de las especies asociadas a *P. sylvestris* (Kuikka et al. 2003) y *Betula pendula* (Last et al. 1979) al aplicar una defoliación artificial. También en este caso, el efecto observado podría ser una consecuencia de la reducción del transporte de hidratos de carbono hacia las raíces (Kuikka et al. 2003).

Los resultados obtenidos hasta ahora sobre la relación hongo-planta-insecto son bastante variables, posiblemente debido al hecho de que varios factores, como por ejemplo el tipo, la severidad (Kolb et al. 1999; Gehring & Whitham 2002) y la duración de herbivoría (Gehring & Whitham 1991; Del Vecchio et al. 1993; Gehring & Whitham 2002), la época del año (Saravesi et al. 2008) y la variación de los parámetros ambientales y edáficos (Gehring & Whitham 1995; Erland & Taylor 2002), contribuyen a modular la respuesta de la comunidad de ECM. De hecho, se ha demostrado que en *P. edulis* los árboles que crecían en un ambiente poco favorable, con un suelo pobre en nutrientes y con escasa humedad, experimentaron una reducción significativa de la colonización micorrícica (19%) en respuesta a la herbivoría, mientras que los árboles que crecían en el ambiente más favorable no experimentaron ningún cambio (Gehring & Whitham 1995). También se comprobó que las plantas que sufrieron una defoliación severa (66%) ocasionada por el lepidóptero *Choristoneura occidentalis* experimentaron una mayor reducción de la colonización micorrícica,

en comparación con las plantas que sufrieron una defoliación moderada (36%) (Kolb et al 1999).

Gehring y Whitham (2002) elaboraron un modelo de predicción de la influencia de la intensidad de la herbivoría y del estrés abiótico al que la planta se ve sometida, sobre la colonización micorrícica (Fig. 13). El modelo realizaba cuatro predicciones: 1) las plantas tienen una mayor colonización micorrícica cuando crecen en ambientes con elevado estrés ambiental abiótico (bajo nivel de nutrientes, baja humedad) y siempre que el estrés biótico (herbivoría) sea reducido 2) la colonización micorrícica se reduce progresivamente al aumentar la intensidad de la herbivoría, independientemente del tipo de ambiente, ya que se acentúa el estrés al que son sometidas las plantas, 3) al incrementar la intensidad de la herbivoría la reducción de la colonización micorrícica será mayor en los ambientes sometidos a un estrés elevado porque las plantas reducen más rápidamente el transporte de carbono hacia las raíces en comparación con las plantas que crecen en ambientes más favorables, y por último 4) la colonización micorrícica alcanza el nivel más bajo en presencia de un elevado estrés ambiental y de una elevada tasa de herbivoría.



**Figura 13.** Modelo de predicción de la interacción entre la intensidad de la herbivoría, el nivel de estrés ambiental y los niveles de colonización micorrícica en una planta hospedadora (modificado de Gehring & Whitham 2002).

**Tabla 5.** Resumen de los estudios realizados entre 1991 y 2008 sobre los efectos de la defoliación sobre la comunidad de ECM (modificado de Saravesi 2008).

Tratamiento	Planta hospedadora	Colonización (%)	Diversidad de especies	Proporción de especies con poca y mucha biomasa	Carpóforos (no.)	Bibliografía
Defoliación por <i>Dioryctria albovittella</i> (Lepidoptera)	<i>Pinus edulis</i>	Reducida				(Gehring & Whitham 1991; Gehring & Whitham 1995)
Defoliación por <i>Matsucoccus acalyptus</i> (Homoptera)	<i>Pinus edulis</i>	Reducida				(Del Vecchio et al. 1993; Gehring et al. 1997)
Defoliación por <i>Matsucoccus acalyptus</i> (Homoptera)	<i>Pinus edulis</i>		Cambia			(Gehring & Whitham 2002)
Defoliación manual	<i>Pinus sylvestris</i>	No cambia	Cambia	Cambia		(Saikkonen et al. 1999)
Defoliación manual	<i>Pinus sylvestris</i>	No cambia				(Markkola 1996)
Defoliación manual	<i>Pinus sylvestris</i>	No cambia	Cambia		Reducidos	(Kuikka et al. 2003)
Defoliación manual	<i>Pinus sylvestris</i>	No cambia				(Saravesi et al. 2008)
Defoliación manual	<i>Pinus contorta</i>	No cambia	Cambia			(Cullings et al. 2001)
Defoliación manual	<i>Pinus contorta</i>		No cambia			(Cullings et al. 2005)
Defoliación por <i>Choristoneura occidentalis</i> (Lepidoptera)	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Reducida				(Kolb et al. 1999)
Defoliación manual	<i>Betula pubescens</i>	No cambia				(Markkola et al. 2004)
Defoliación manual	<i>Betula pendula</i>				Reducidos	(Last et al. 1979)
Defoliación manual	<i>Salix repens</i>	No cambia	Cambia	Cambia		(Saravesi 2008)
Defoliación por mamíferos	<i>Salix</i> sp.	Reducida				(Rossow et al. 1997)
Defoliación por <i>Lymantria dispar</i> (Lepidoptera)	<i>Populus canadensis</i>	No cambia	No cambia			(Kosola et al. 2004)
Defoliación por insectos gallicolas (Cynipidae)	<i>Quercus turbinella</i>	Reducida				(Mueller et al. 2005)



#### 2.1.4.2. Efecto de los hongos micorrícicos sobre los herbívoros

Así como la herbivoría afecta a la micorrización, también se ha documentado el fenómeno inverso. Bennett et al. (2006) propusieron 5 hipótesis a través de las cuales los beneficios nutricionales aportados por los hongos micorrícicos podrían alterar la interacción que se establece entre la planta y sus enemigos naturales: 1) las micorrizas incrementan el tamaño de la planta generando un efecto positivo sobre los herbívoros que pueden disponer de una mayor cantidad de alimento, 2) las micorrizas aumentan la calidad nutricional de la planta hospedadora en beneficio de los herbívoros, 3) las micorrizas aumentan la tolerancia de la planta a los herbívoros y aumentan la capacidad de recuperación de los tejidos vegetales dañados después del ataque, 4) los nutrientes aportados por los hongos micorrícicos permiten a la planta incrementar su inversión en defensas contra los enemigos naturales, y 5) las micorrizas reducen el ataque de nemátodos y herbívoros de las raíces.

Recientemente se ha incrementado el número de estudios sobre los efectos indirectos que las micorrizas VA y ECM ejercen sobre los herbívoros. Todos ellos siguen básicamente el mismo protocolo. Primero las plantas son inoculadas con una sola especie de hongo micorrícico, que en el caso de las micorrizas VA suelen pertenecer al género *Glomus*, y luego son sometidas a la defoliación por parte distintas especies de insectos fitófagos. Al cabo de un tiempo, que varía según el tipo de micorriza, se mide la supervivencia y la abundancia de los insectos, el crecimiento, el contenido en nutrientes y la tolerancia a la defoliación de la planta hospedadora y se comparan los resultados con el grupo control sin inocular (Gehring & Bennett 2009). Sin embargo este método no tiene en cuenta la variabilidad ecológica de las diferentes especies de micorrizas, ya que los beneficios nutricionales que aportan a la planta hospedadora varían según el taxón. Esto significa que según el tipo de hongo que se inocule, la respuesta de la planta a los enemigos naturales también variará (Hart et al. 2001; Hart & Reader 2002; Klironomos 2003; Karst et al. 2008; Gehring & Bennett 2009). Gehring & Bennett (2009) realizaron una revisión sobre este argumento, encontrando en el 45% de las interacciones con micorrizas VA y en el 40% de las interacciones con las ECM, la existencia de un efecto positivo de los hongos sobre la abundancia de los insectos herbívoros. Por otra parte, encontraron un efecto negativo en el 35% de las interacciones con micorrizas VA y en el 20% de las interacciones con ECM. Se detectó además un efecto neutro en el 21% de los casos con micorrizas VA y en el 30% de los casos con ECM.

Utilizando como planta hospedadora *Populus angustifolia* x *P. fremontii* se analizó el efecto de las micorrizas VA (*Glomus* spp., *G. etunicatum*, *G. clarum* y *Entrophosphora colombiana*) y de las ECM (*Pisolithus tinctorius*) sobre el áfido especialista *Chaitophorus populicola*. La población de áfidos fue 6,9 veces mayor en las plantas con ECM que en las plantas con micorrizas VA, demostrando que existen grandes diferencias en los beneficios que aportan los diferentes tipos de hongos micorrícicos a la planta hospedadora (Gehring & Whitham 2002). Estos beneficios podrían concretarse por ejemplo en un incremento de nutrientes, tal y como se ha comprobado en el caso del arbusto perenne *Baccharis halimifolia*, para el cual el aumento de N en las hojas generado por los hongos micorrícicos del tipo VA y ECM incrementó la densidad de 3 dípteros herbívoros, 2 generalistas minadores de hojas, *Amauromyza maculosa* y *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae), y un especialista productor de agallas, *Neolasoptera lathamii* (Diptera: Cecidomyiidae) (Younginger et al. 2009).

El efecto que ejercen las micorrizas sobre las poblaciones de los insectos fitófagos puede cambiar también en función del tipo de herbivoría y del grado de especialización del insecto. Los insectos fitófagos generalistas suelen responder a la colonización de su planta hospedadora por parte de micorrizas VA y ECM reduciendo el grado de ataque, mientras que los insectos herbívoros especialistas en general aumentan su presencia (Gange et al. 2002b). Se ha hipotetizado entonces que, en comparación con los insectos generalistas, los especialistas sean menos susceptibles a los compuestos de defensa producidos por la planta hospedadora, cuya secreción es incrementada por la presencia de las micorrizas (Gehring & Whitham 2002). De hecho se ha demostrado que la colonización de micorrizas VA en *Plantago lanceolata* incrementa significativamente la concentración los glucósidos iridoides (aucubina y catalpol), que afectan negativamente al desarrollo de las larvas del lepidóptero generalista *Arctia caja* (Gange & West 1994).

Resultados más contundentes se han obtenido al estudiar el efecto de las micorrizas sobre los herbívoros que afectan a las raíces, ya que en la mayoría de los casos los hongos lograron disminuir el grado de ataque (Gange 2007). Esto es debido a que la colonización micorrícica incrementa la síntesis de sustancias químicas, como los glucósidos iridoides, que pueden aumentar la resistencia de la planta frente a hongos patógenos, bacterias, nemátodos e insectos herbívoros del suelo (Strack et al. 2003; De Deyn et al. 2009). Además se ha demostrado que las micorrizas VA pueden inducir la biosíntesis de jasmonato en las raíces, un componente importante en la respuesta de las plantas frente a insectos fitófagos (Hause et al. 2002).

## 2.2. Objetivos del estudio

Los principales objetivos del presente estudio fueron:

- Determinar la composición de especies ectomicorrícicas asociadas a *Pinus pinaster* utilizando la metodología clásica, basada en la identificación morfológica, y las técnicas moleculares.
- Establecer si la defoliación provoca una respuesta compensatoria en la planta, disminuyendo el porcentaje total de micorrización, la abundancia, diversidad y riqueza de las especies ectomicorrícicas.
- Estudiar que porcentaje de defoliación afecta más a la comunidad micorrícica y a las variables de crecimiento de las plantas.
- Determinar a través de dos defoliaciones sucesivas si la respuesta de la planta y de la comunidad micorrícica es inmediata o a largo plazo.

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Descripción de las zonas de estudio

Las localidades seleccionadas para este estudio se encuentran situadas en la provincia de Pontevedra, Galicia, NW de España (Fig. 14).



Figura 14. Ubicación de las dos parcelas experimentales.

La zona costera de Galicia se caracteriza por un clima húmedo atlántico sin largos periodos de sequía y con precipitaciones uniformemente distribuidas a lo largo del año de aproximadamente 700 mm (Martínez Cortizas & Pérez Alberti 2000). Sin embargo, el otoño del año 2007 fue considerado el más seco de los últimos 50 años en Pontevedra (Consellería de Medio Ambiente 2008).

#### 2.3.1.1. Parcela A

La primera parcela está localizada en el ayuntamiento de Catoira (42°38'N8°41'W), a una altitud de 370 m. La zona está situada en un bosque maduro de aproximadamente unos 60 años, en donde el pino marítimo es la especie predominante. En la parcela seleccionada abundan individuos jóvenes (4-6 años) de *P. pinaster* procedentes de regeneración natural, después de la tala de una parte del bosque en el 2001 (Fig. 15).



**Figura 15.** Vista general de la parcela A situada en Catoira (Pontevedra).

La vegetación asociada a esta parcela está compuesta principalmente por árboles aislados (*Pyrus cordata* Desv., *Frangula alnus* Miller, *Quercus robur* L., *Pinus radiata* Don.), arbustos (*Ulex* sp., *Erica* sp., *Rubus* sp., *Calluna vulgaris* (L.) Hull y *Daboecia cantabrica* (Hudson) K. Koch.) y herbáceas (*Agrostis curtisii* Kerguelen, *Mentha rotundifolia* L., *Pteridium aquilinum* (L.) Kunth, *Digitalis purpurea* L., *Asphodelus albus* Willd., *Narcissus bulbocodium* L., *Potentilla erecta* (L.) Rauschel., *Lithodora prostrata* (Loisel) Grises).

De acuerdo con el mapa de suelos de Galicia (Macías & Calvo de Anta 2008) en esta parcela predominan *regosoles alumiúmbricos* (en la clasificación actual serían Umbrisoles

cumuli-areni-endolépticos) que corresponden a suelos forestales con A úmbrico relativamente profundo y con aportes de madera.

Los suelos están formados sobre granito migmatítico y compuestos por un 20-40% de cuarzo, 25% o menos de feldespato alcalino (normalmente potásico) con cantidades menores de mica moscovita y/o biotita, y algunos minerales accesorios, son ácidos y de bajo contenido en bases, debido al elevado contenido en cuarzo de las rocas originales. Tienen una coloración amarillenta o de color café amarillento debido al buen drenaje y al bajo contenido en hierro de la roca madre.

**Tabla 6.** Datos termopluviométricos medios mensuales de la estación meteorológica de Caldas de Reis recogidos durante el periodo de estudio.

	2007		2008		2009	
	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)
<b>Enero</b>	9,0	75	10,1	253	7,8	288
<b>Febrero</b>	10,0	250	12,3	63	9,2	76
<b>Marzo</b>	9,4	43	9,7	135	11,9	29
<b>Abril</b>	13,3	87	12,6	198	10,4	66
<b>Mayo</b>	13,9	99	13,4	132	-	-
<b>Junio</b>	15,9	135	17,4	24	-	-
<b>Julio</b>	17,8	81	17,9	53	-	-
<b>Agosto</b>	18,3	33	18,2	73	-	-
<b>Septiembre</b>	18,2	25	16,5	58	-	-
<b>Octubre</b>	15,1	4	13,8	92	-	-
<b>Noviembre</b>	10,9	85	9,3	96	-	-
<b>Diciembre</b>	9,2	91	8,6	165	-	-

Los datos termopluviométricos medios mensuales se recogieron en la estación meteorológica de Caldas de Reis (42°35'N8°37'W) a 268 m de altitud. En el 2007, la temperatura media anual fue 13,4°C, con precipitaciones anuales de 1008 mm de lluvia. En el 2008, la temperatura media fue de 13,3°C, con una precipitación anual de 1342 mm de lluvia. Los datos mensuales se resumen en la Tabla 6.

## 2.3.1.2. Parcela B

La segunda parcela está situada en Cotobade (42°29'N8°29'W) a una altitud de 545 m. La zona está poblada por individuos jóvenes de *P. pinaster* de aproximadamente 5-6 años y procedentes de regeneración natural (Fig. 16). La vegetación asociada a esta parcela está compuesta principalmente por arbustos (*Ulex* sp., *Erica* sp., *Rubus* sp., *Calluna vulgaris* (L.) Hull y *Daboecia cantabrica* (Huds) K. Koch.) y herbáceas (*Agrostis truncatula* subsp. *commista* Castrov. & Charpin, *Agrostis curtisii* Kerguelen, *Mentha rotundifolia* L., *Pteridium aquilinum* (L.) Kunth, *Digitalis purpurea* L., *Asphodelus albus* Willd. *Narcissus bulbocodium* L., *Potentilla erecta* (L.) Rauschel., *Lithodora prostrata* (Loisel) Griseb., *Hypochaeris radicata* L., *Romulea clusiana* (Lange) Nyman, *Teesdalia nudicaulis* (L.) R. Br. in W.T. Aiton, *Senecio lividus* L., *Aira praecox* L., *Cerastium pumilum* Curtis, *Merendera Montana* (L.) Lange, *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm).

De acuerdo con el mapa de suelos de Galicia (Macías & Calvo de Anta 2008) en esta parcela predominan *leptosoles úmbricos* que corresponden a suelos forestales con A úmbrico. En la clasificación actual serían *umbrisoles epilépticos*.



**Figura 16.** Vista general de la parcela B situada en Cotobade (Pontevedra).

Los suelos están formados sobre micaesquistos grises y esquistos verdes albíticos. Las rocas son metamórficas, con un origen primario ígneo o sedimentario, en las que se observa una ordenación y disposición paralela de la mayor parte de sus minerales constituyentes. Reciben distintos nombres según sus constituyentes que pueden ser: feldespatos, cuarzos, cantidades pequeñas de mica, a veces carbonato cálcico y silicatos en capas como la

caoninita o la ilita. Los suelos formados sobre esquistos arcillosos tienen una textura fina, son impermeables, tienen un contenido en bases medio y pH bajo, debido al intenso lavado que sufren en este clima. También hay suelos de textura limosa con un mayor drenaje cuando contienen cuarzo o sericita (mica).

Los datos termopluviométricos medios mensuales se recogieron en la estación meteorológica de Cotobade (42°28'N8°30'W) a 367 m de altitud. En el 2007, la temperatura media anual fue 12,3°C, con precipitaciones anuales de 1112 mm de lluvia. En el 2008, la temperatura media fue de 11,6°C, con precipitaciones anuales de 1488 mm de lluvia. Los datos mensuales aparecen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Datos termopluviométricos medios mensuales de la estación meteorológica de Cotobade recogidos durante el periodo de estudio.

	2007		2008		2009	
	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)	T <sup>a</sup> (°C)	Prec.(mm)
<b>Enero</b>	7,9	90	8,1	215	6,0	320
<b>Febrero</b>	8,5	282	10,2	80	6,9	103
<b>Marzo</b>	9,2	114	8,1	138	10,5	49
<b>Abril</b>	12,4	58	11,1	218	8,2	100
<b>Mayo</b>	13,3	100	11,7	211	-	-
<b>Junio</b>	15,0	167	16,5	28	-	-
<b>Julio</b>	17,0	96	16,7	55	-	-
<b>Agosto</b>	17,8	27	16,8	95	-	-
<b>Septiembre</b>	17,5	20	14,9	67	-	-
<b>Octubre</b>	13,6	5	11,7	90	-	-
<b>Noviembre</b>	8,6	76	7,7	101	-	-
<b>Diciembre</b>	6,6	77	6,5	190	-	-

### 2.3.2. Parámetros edáficos

Para caracterizar las parcelas, se determinó el pH y la concentración de nutrientes (C, N, P, K, Ca, Mg). El muestreo se llevó a cabo en abril del 2007 y se utilizó una barrena para la extracción de muestras de suelo (Eijkelkamp Agrisearch Equipment, The Netherlands) de 750 cm<sup>3</sup>. Se recogieron seis muestras (dos en cada bloque) por localidad. Para los análisis edafológicos, las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron a 2 mm. El carbono orgánico en el suelo se determinó utilizando el método rápido de Walkley-Black (Walkley &

Black 1934). Para la determinación del N se utilizó el método semimicro Kjeldahl (Bremner 1982). Ca, Mg y K cambiabiles fueron extraídos en acetato amónico 1N a pH 7 y determinados por absorción atómica (Ca y Mg) y fotometría de llama (K) (Knudsen et al. 1982). El P se valoró siguiendo el método Bray-II (Bray & Kurtz 1945), mientras que el pH se determinó por potenciometría en agua después de una hora de contacto. La determinación de la humedad residual de la muestra se hizo mediante secado en estufa a 105°C hasta obtener un peso constante. Los resultados presentados se expresan en peso seco (Tabla 8).

**Tabla 8.** Parámetros edáficos medidos en las dos parcelas de estudio. Los datos representan las medias con el error estándar.

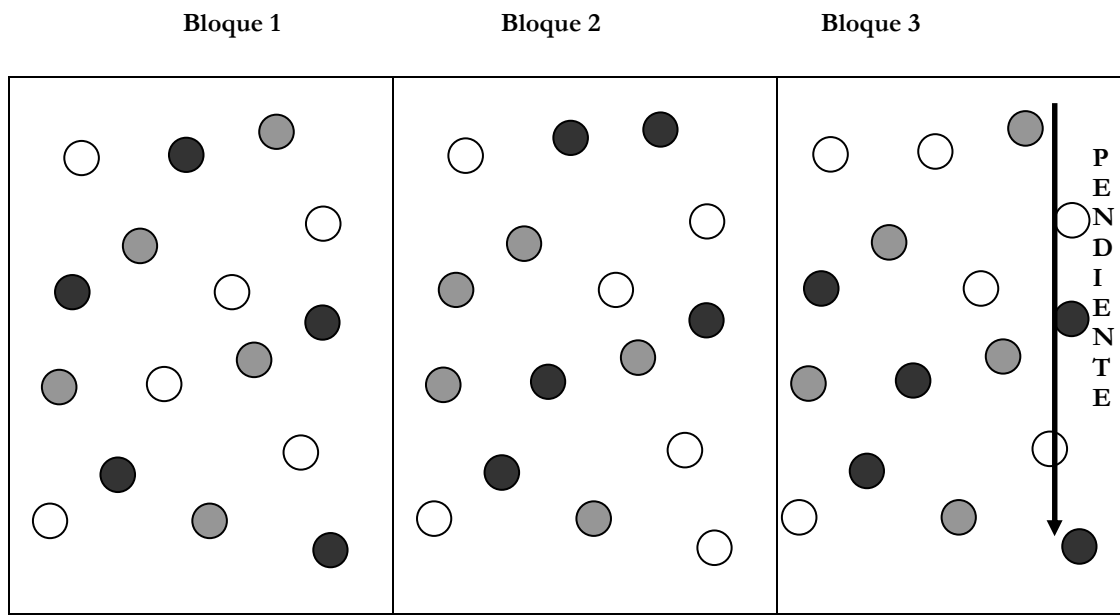
	Parcela A	Parcela B
<b>pH (H<sub>2</sub>O)</b>	4,16 ± 0,06	4,13 ± 0,09
<b>Materia orgánica (%)</b>	15,11 ± 2,09	8,43 ± 0,53
<b>C orgánico (%)</b>	8,76 ± 1,21	4,89 ± 0,31
<b>N total (%)</b>	0,64 ± 0,09	0,54 ± 0,03
<b>C/N</b>	13,62 ± 0,79	9,16 ± 0,50
<b>P disponible (ppm)</b>	16,81 ± 3,40	74,47 ± 11,23
<b>K (ppm)</b>	70,55 ± 9,64	36,12 ± 1,81
<b>Ca (ppm)</b>	30,09 ± 9,22	17,62 ± 2,94
<b>Mg (ppm)</b>	31,08 ± 5,86	9,25 ± 3,06

### 2.3.3. Diseño experimental

En cada parcela se eligieron al azar 45 individuos de *P. pinaster* de 2-3 m de altura con una edad aproximada de 5-6 años. La edad fue estimada contando el número de verticilos. Se mantuvo una distancia mínima de 2 m entre individuos para evitar solapamientos entre las comunidades de ECM asociadas a las raíces. Las plantas fueron distribuidas aleatoriamente en tres bloques. En cada bloque se aplicaron tres tratamientos (Fig. 17) con cinco réplicas para cada uno. Los tratamientos aplicados fueron:

1. Control: sin defoliación ○
2. Defoliación ligera: eliminación del 25% de las acículas de los años anteriores ●
3. Defoliación severa: eliminación del 75% de las acículas de los años anteriores. ●





**Figura 17.** Ramilletes defoliados simulando un ataque de procesionaria (a,b). La base de las acículas no ha sido cortada. Los árboles experimentales con los tres niveles de defoliación: control (c), defoliación ligera (d) y defoliación severa (e).

La defoliación se aplicó durante el mes de abril de 2007 y 2008. A lo largo del experimento se comprobó la ausencia de insectos defoliadores en los árboles seleccionados. Antes de la defoliación (2007) y después (2008) se midieron una serie de indicadores de crecimiento de las plantas: altura del árbol, diámetro del tronco, altura de la copa, diámetro de la copa, número de brotes, longitud del brote principal, longitud de los brotes terminales de los tres primeros verticilos (empezando desde la parte de arriba del árbol), longitud media de cuatro acículas en la guía terminal y número de piñas.

#### 2.3.4. Recogida de muestras y limpieza en el laboratorio

El muestreo de los ápices micorrizados se realizó en junio-julio de 2007 y se repitió en los mismos meses durante el 2008. Para ello se retiró cuidadosamente con una pala la tierra alrededor de la base del tronco (Fig. 18a-d). Después de eso, con un escardillo de jardinero se excavó unos 20-30 cm hasta desenterrar las raíces principales de la planta. No fue necesaria una excavación más profunda, ya que las ECM se distribuyen en el horizonte orgánico del suelo (Allen 1991). Para cada planta se cortaron aproximadamente 2 m de raíces finas ( $\leq 2$  mm) que fueron introducidas en bolsas de plástico, etiquetadas y transportadas al laboratorio. Las raíces se almacenaron y conservaron en la nevera hasta su limpieza, durante un tiempo no superior a dos semanas desde el muestreo. Las muestras fueron lavadas y separadas de la materia mineral en una bandeja con agua destilada, trabajando bajo una lupa para evitar dañar los ápices micorrizados. Las raíces lavadas se conservaron en botes de cristal a 4°C a la espera de ser analizadas.

Los carpóforos se recogieron con frecuencia semanal desde abril 2007 hasta abril 2009. Sólo se recolectaron las setas que crecían a una distancia de 1,5 m del tronco de cada árbol (Fig. 18e,f). En el laboratorio las setas fueron identificadas utilizando guías y claves dicotómicas (Breitenbach & Kränzlin 1981; Moreno et al. 1986; Mendaza Rincón & Díaz Montoya 1987; Castro 2004; Marcote et al. 2005). Se reservaron aproximadamente unos 100 mg de los carpóforos no identificados macroscópicamente, que fueron conservados en el congelador a -20°C para efectuar posteriormente el análisis molecular. Finalmente, los carpóforos fueron contados y secados en estufa a 60°C durante 48h. Para estimar el peso seco fueron introducidos en un desecador con silica gel durante unas horas hasta que alcanzaron un peso constante y luego fueron pesados.

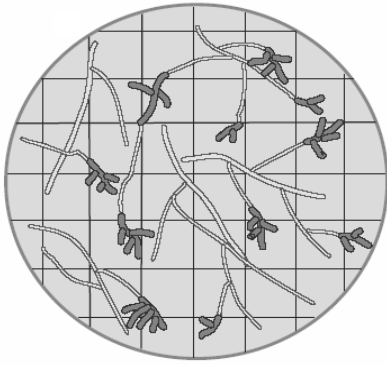


**Figura 18.** Recolección de las muestras (a-d). Carpóforos encontrados en la base de los árboles experimentales (e,f).

#### 2.3.4.1. Porcentaje de micorrización

Para evaluar el porcentaje de micorrización se utilizó el método de intersección de la cuadrícula (Giovannetti & Mosse 1980; Brundrett et al. 1996). Este método permite medir simultáneamente la longitud radicular y el porcentaje de la colonización micorrícica de una muestra de raíces. Aunque inicialmente el método se diseñó para medir la colonización de

micorrizas VA (Giovannetti & Mosse 1980), actualmente también está siendo utilizado en ECM (Brundrett et al. 1996) (Fig. 19).



**Figura 19.** Dibujo esquemático del método de intersección de la cuadrícula utilizado para cuantificar la longitud radicular y la colonización ectomicorrícica (Brundrett et al. 1996). La longitud radicular se expresa a través del número de intersecciones entre los fragmentos de raíces y la cuadrícula. El porcentaje de colonización es la proporción de raíz colonizada por las micorrizas.

Para ello aproximadamente 2 m de raíces finas (diámetro  $\leq 2$  mm) fueron cortados en fragmentos de 1 cm. Del total de fragmentos, 60 fueron elegidos al azar, y colocados en una placa de Petri de 9 cm de diámetro a la que se ha incorporado en el fondo una plantilla con una cuadrícula de 1 cm de lado (Fig. 19). Se efectuaron tres réplicas para cada muestra. Bajo el esteromicroscopio, a 10x de aumento, se contó el número de las intersecciones de las raíces con la cuadrícula, apuntando si estas estaban micorrizadas o no. Un mismo fragmento puede cruzar varias veces la cuadrícula, sobre todo cuando el hongo micorrícico forma grandes agregados de ápices, contabilizándose tantas veces como cruce las líneas. Para calcular el porcentaje de micorrización se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Micorrización} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de intersecciones de ápices micorrizados}}{\text{n}^\circ \text{ total de intersecciones}} \times 100$$

### 2.3.5. Descripción morfológica de las ectomicorrizas (morfortipos)

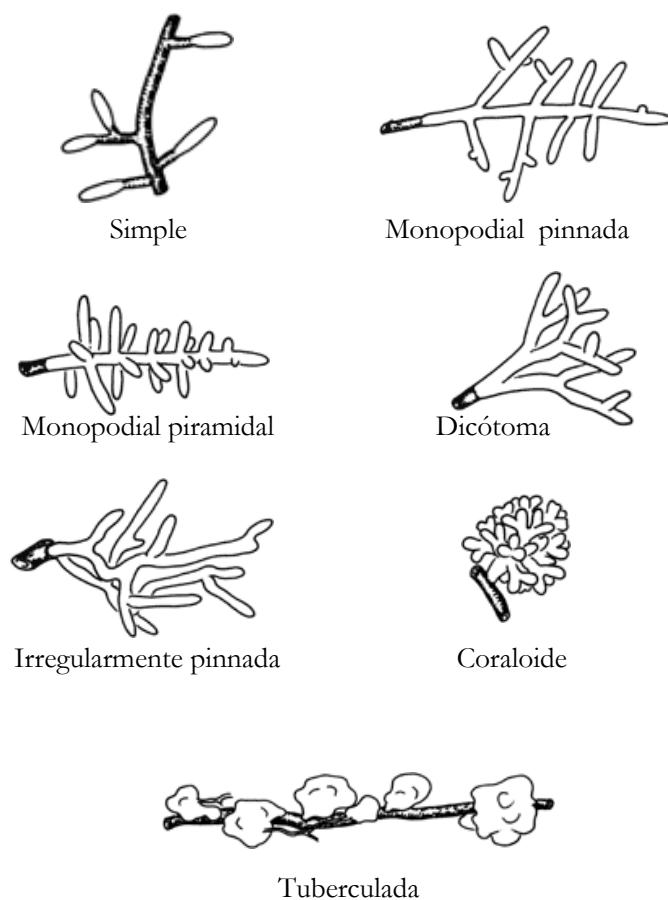
En los mismos fragmentos utilizados para evaluar el porcentaje de micorrización, se diferenciaron los morfortipos de ECM presentes en las raíces de cada árbol. Las características morfológicas utilizadas para clasificar los morfortipos son las descritas por Agerer (1987-2002). Los ápices fueron primero clasificados utilizando una lupa de disección, y luego recibieron una breve descripción y un código identificativo. Una vez descritos los morfortipos, se hicieron fotografías de sus características más representativas, elaborando una ficha descriptiva para cada uno. Para la toma de fotografías se utilizó una

cámara digital Nikon Digital Sight DS-Fi1 de alta resolución, conectada al microscopio y el software NIS-Elements, diseñado para la captura, almacenamiento y análisis de imagen. Para efectuar posteriormente el análisis molecular, para cada morfotipo se reservaron aproximadamente unos 100 mg en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, conservados en el congelador a -20°C.

### 2.3.5.1. Características morfológicas

Las características morfológicas utilizadas fueron las siguientes:

- Longitud del sistema micorrícico, diámetro del eje principal y tipo de ramificación. (Fig. 20).
- Forma, superficie, longitud, diámetro y color de las terminaciones no ramificadas.
- Presencia y abundancia de elementos que emanan del manto: hifas, cistidios, rizomorfos y esclerocios. Se determinó además la forma, las dimensiones, el color y la conexión con el manto de estos elementos.



**Figura 20.** Tipos de ramificación del sistema micorrícico (Agerer & Rambold 2004-2009).



2.3.5.2. Características anatómicas del manto

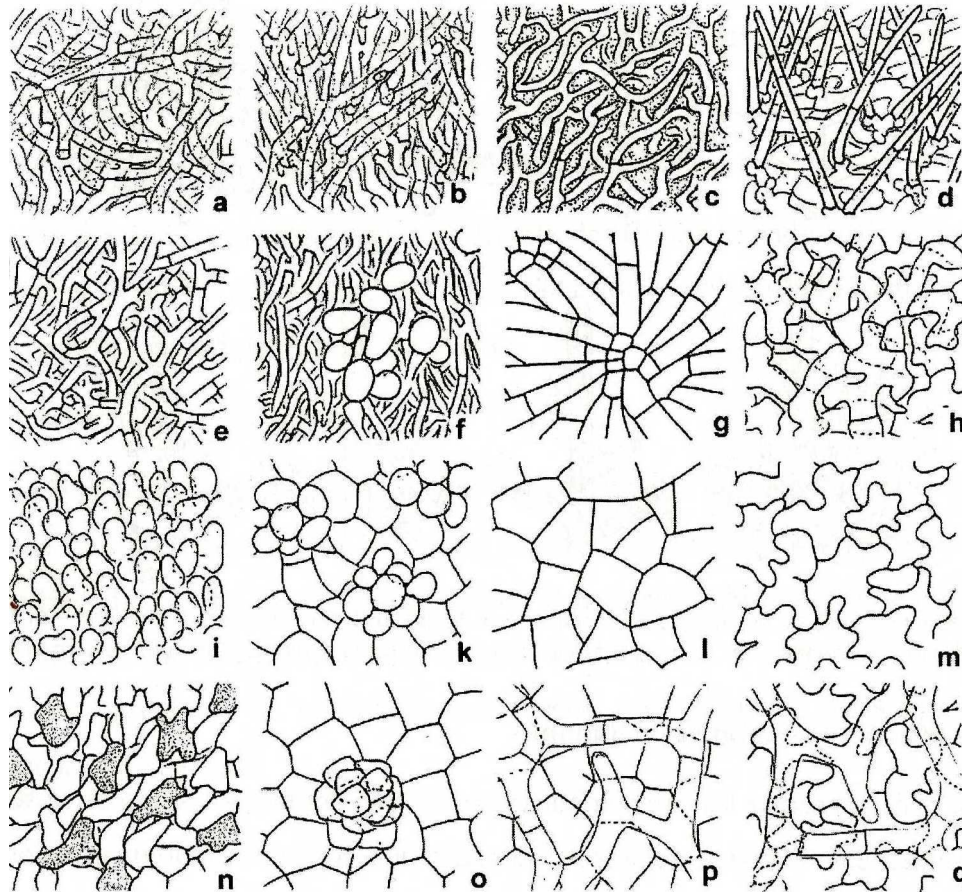
Para analizar el manto es necesario primero separarlo cuidadosamente de la raíz, bajo una lupa, con la ayuda de pinzas entomológicas muy finas y de una aguja enmangada. A continuación se hace una preparación con ácido láctico y se observa al microscopio a 400x para determinar el tipo de manto (Fig. 22), la pigmentación y las dimensiones de las células. Se pueden distinguir dos tipos de manto:

- Manto plectenquimático: se aprecian las hifas individualizadas.
- Manto pseudoparenquimático: no se observan hifas debido a que el diámetro de sus células es muy grande o porque han formado células más cortas e irregulares.

En la Tabla 9 aparecen algunos ejemplos de hongos micorrícicos asociados con el género *Pinus* y el tipo de manto que desarrollan. En ocasiones una misma especie puede presentar varios tipos de manto. Por ejemplo, *Paxillus involutus* puede presentar manto tipo “b” o “d” y *Russula sardonia* puede presentar manto tipo “q” o “n”.

**Tabla 9.** Ejemplos de ectomicorrizas asociadas con el género *Pinus* que muestran los distintos tipos de manto establecidos por Agerer (1991) (Agerer & Rambold 2004-2009).

Plectenquimático	Pseudoparenquimático
<b>a</b> <i>Amanita citrina</i> , <i>Cortinarius odorifer</i> , <i>Tomentellopsis submollis</i> , <i>Tylopilus felleus</i>	<b>k</b> <i>Russula emetica</i> , <i>Russula atrorubens</i>
<b>b</b> <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Paxillus involutus</i>	<b>l</b> <i>Tuber aestivum</i> , <i>Tuber brumale</i>
<b>c</b> <i>Inocybe terrigena</i> , <i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Rozites caperatus</i>	<b>m</b> <i>Tuber borchii</i>
<b>d</b> <i>Gomphidius roseous</i> , <i>Thelephora terrestres</i> , <i>Russula nigricans</i>	<b>n</b> <i>Russula emetica</i> , <i>R. sardonia</i>
<b>e</b> <i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Amanita muscaria</i>	<b>p</b> <i>Tomentella albomarginata</i> ,
<b>f</b> <i>Suillus bovinus</i> , <i>S. collinitus</i>	<b>q</b> <i>Russula xerampelina</i> , <i>Tuber borchii</i>
<b>g</b> <i>Cenococcum geophilum</i>	
<b>h</b> <i>Craterellus tubaeformis</i>	
<b>i</b> no encontrado en el género <i>Pinus</i>	



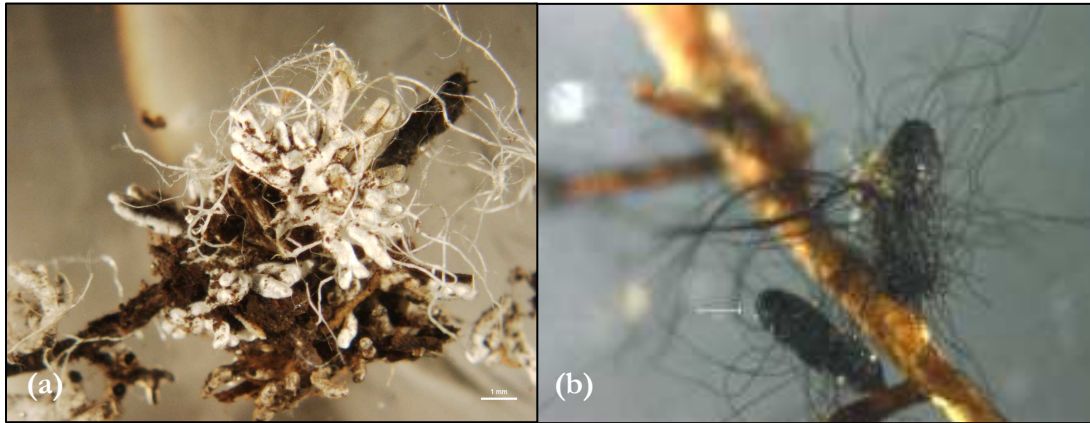
**Figura 22.** Tipos de manto. **a)** Plectenquimático, con hifas curvadas formando anillos; **b)** Plectenquimático, con hifas distribuidas de forma irregular, pero que crecen en dirección longitudinal con respecto a la orientación de la raíz; **c)** Plectenquimático, con hifas inmersas en una matriz gelatinosa; **d)** Plectenquimático, con hifas dispuestas formando una red y cistidios prominentes; **e)** Plectenquimático, con hifas dispuestas formando una red, ramificadas de forma retorcida; **f)** Plectenquimático, con grupos de células redondeadas sobre las hifas; **g)** Plectenquimático, con hifas dispuestas de forma radiada; **h)** de transición entre plectenquimático y pseudoparenquimático, con hifas de forma irregular; **i)** Plectenquimático, con hifas con terminaciones robustas y algo curvadas que sobresalen; **k)** Pseudoparenquimático poligonal con grupos de células redondeadas sobre las células angulares; **l)** Pseudoparenquimático poligonal con células angulares; **m)** Pseudoparenquimático en puzzle con células epidermoides; **n)** Pseudoparenquimático con células de contenido acuoso que se tiñen con sulfovanilina; **o)** Pseudoparenquimático con cúmulos de células aplanadas sobre las células angulares; **p)** Pseudoparenquimático con células angulares sobre las que se dispone una ligera red de hifas; **q)** Pseudoparenquimático con células en puzzle sobre las que se dispone una ligera red de hifas (Agerer 1987-2002).

### 2.3.5.3. Características de los elementos que emanan

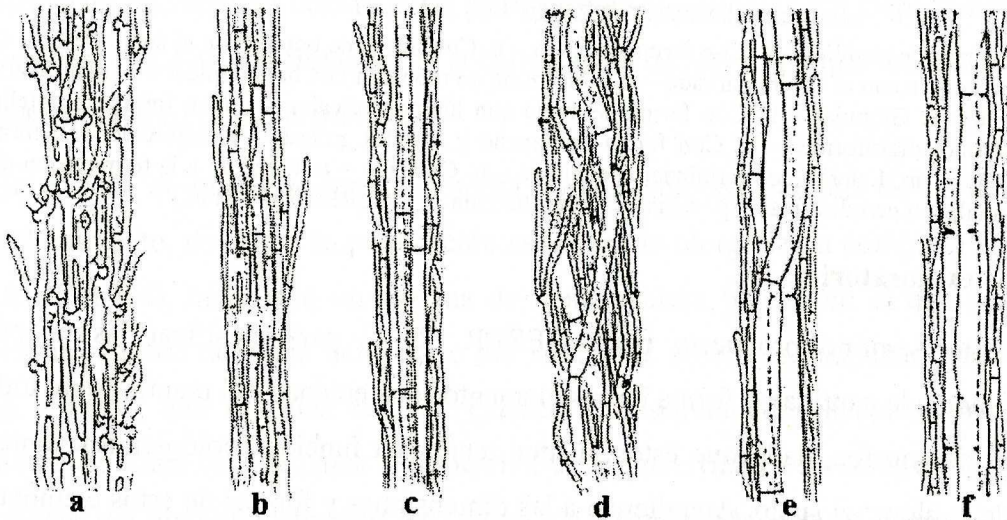
Otra característica morfológica importante de las micorrizas, son los elementos que emanan del manto, tal y como los rizomorfos, las hifas y los cistidios. Los rizomorfos son un conjunto de hifas fuertemente apretadas y resistentes que forman un cordón entre ellas



(Fig. 23a), recordando en ocasiones a las raíces de las plantas superiores. Se suele describir su abundancia, diámetro, tipo (Fig.24), conexión con el manto (Fig. 25), color y morfología de la superficie.

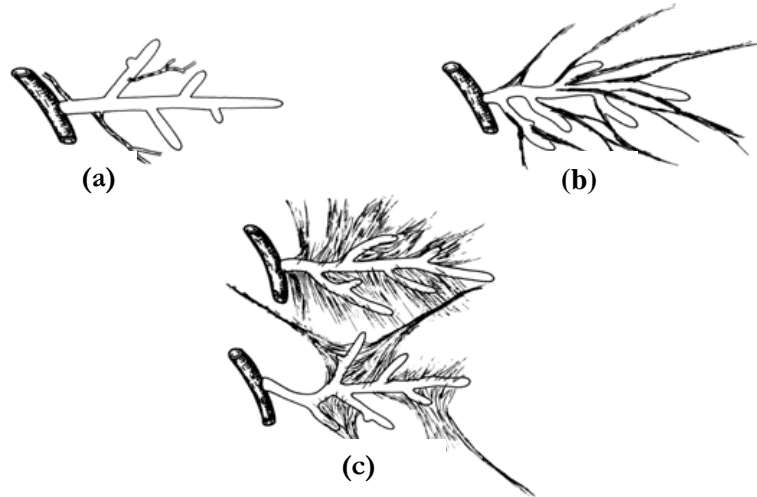


**Figura 23.** Rizomorfos formados por *Sclerderma citrinum* (a). Hifas que emanan en un ejemplar de *Cenococcum geophilum* (b).



**Figura 24.** Tipos de rizomorfos. a) No diferenciado, con hifas uniformes ligeramente entretejidas; b) No diferenciado, con hifas uniformes densamente entretejidas; c) Ligeramente diferenciado, con hifas centrales ensanchadas pero con los septos completos; d) Diferenciado, con las hifas ensanchadas distribuidas de forma aleatoria cuyos septos pueden presentar poros; e) Diferenciado, con hifas centrales ensanchadas cuyos septos pueden presentar poros; f) Muy diferenciado, con hifas centrales ensanchadas con los septos parcial o totalmente disueltos, hifas denominadas “vessel-like” y traducido con hifas pseudovasculares (Agerer 1987-2002).

En la Tabla 10 aparecen algunos ejemplos de hongos ectomicorrícicos asociados al género *Pinus* que presentan diferentes tipos de rizomorfos (indicados por las letras). Es importante destacar que la misma especie micorrícica puede presentar varios tipos de rizomorfos.



**Figura 25.** Forma de conexión de los rizomorfos con el manto. **a)** En puntos restringidos; **b)** Creciendo a partir del extremo de las terminaciones micorrizadas de la raíz; **c)** En forma de abanico (Agerer & Rambold 2004-2009).

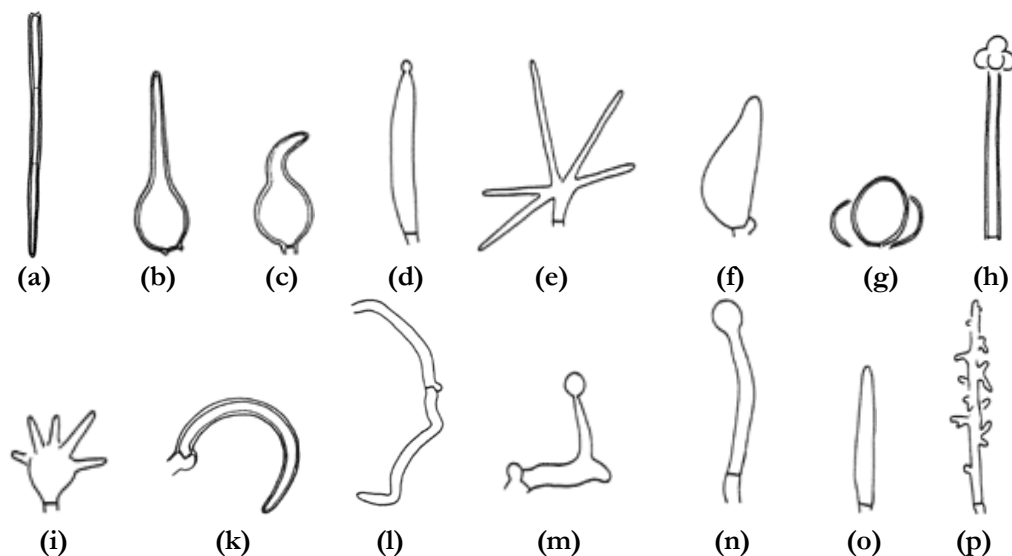
**Tabla 10.** Especies ectomicorrícicas asociadas al género *Pinus* clasificadas en función del tipo de rizomorfos que forman (Smith & Read 2008).

<b>a</b>	<i>Gomphidius roseus</i> , <i>Russula sardonia</i> , <i>Thelephora terrestris</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Tomentellopsis submollis</i>
<b>b</b>	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Tricholoma sejunctum</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Tomentellopsis submollis</i>
<b>c</b>	<i>Amanita muscaria</i> , <i>Cortinarius malachius</i> , <i>Lactarius deliciosus</i>
<b>d</b>	<i>Cortinarius odorifer</i>
<b>e</b>	<i>Russula nigricans</i>
<b>f</b>	<i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Scleroderma citrinum</i> , <i>Suillus bovinus</i>

Las hifas son un conjunto de células dispuestas en filas ordenadas (Fig. 23b). Se suele describir su abundancia, color y morfología de la superficie.

Los cistidios son células especializadas que pueden adquirir múltiples formas (Fig. 26) y que están presentes en los carpóforos y en las estructuras vegetativas, cubriendo el manto y los rizomorfos. Aunque es un carácter taxonómico muy utilizado su función no está clara, aunque se cree que podrían intervenir en la protección frente a depredadores (Agerer 2006;

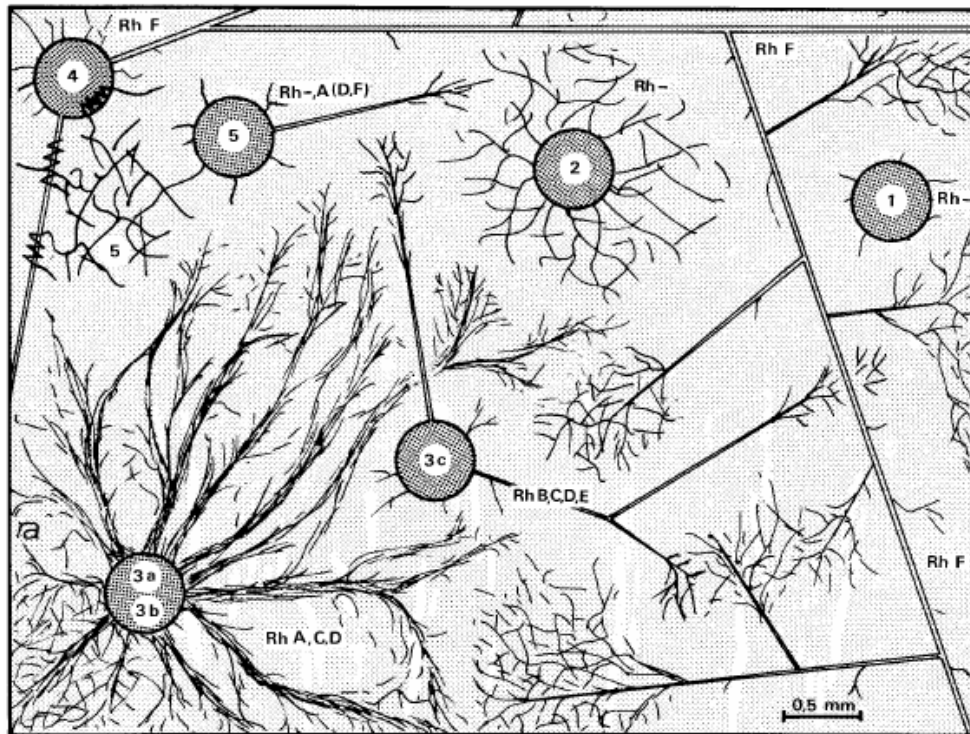
Nakamori & Suzuki 2007). Se describe su abundancia, forma y morfología de la superficie. Es posible que el mismo hongo presente distintos tipos de cistidios, de hecho *Paxillus involutus* presenta cistidios fusiformes (tipo f) y globulares (tipo g).



**Figura 26.** Tipos de cistidios. **a)** Con forma de aguja; **b)** Con forma de botella con el cuello recto; **c)** Con forma de botella con el cuello curvado; **d)** Con forma de tubo y con una bolita apical; **e)** Ramificado; **f)** Fusiforme; **g)** Globular; **h)** Con forma de aguja con lóbulos apicales; **i)** Con forma de botella con evaginaciones digitiformes; **k)** Con forma de gancho y paredes gruesas; **l)** Retorcido, con forma de sacacorchos; **m)** Lateral, con terminación capitada; **n)** Capitado; **o)** Parecido a la terminación de una hifa normal, con paredes finas; **p)** Acantocistidio (Agerer & Rambold 2004).

#### 2.3.5.4. Tipo exploratorio

El concepto de “tipo exploratorio” de una micorriza fue propuesto por Agerer para clasificar los hongos micorrícicos, basándose en su forma de propagarse en el suelo (Agerer 2001). Los distintos tipos exploratorios se asignan teniendo en cuenta la cantidad y la forma de los elementos que emanan del manto, sobre todo las hifas y los rizomorfos (Fig. 27). A continuación aparece una lista con los distintos tipos exploratorios y algunos ejemplos de ECM asociadas con el género *Pinus* que los presentan. (Rh-) = ausencia de rizomorfos; A-F = tipos de rizomorfos.

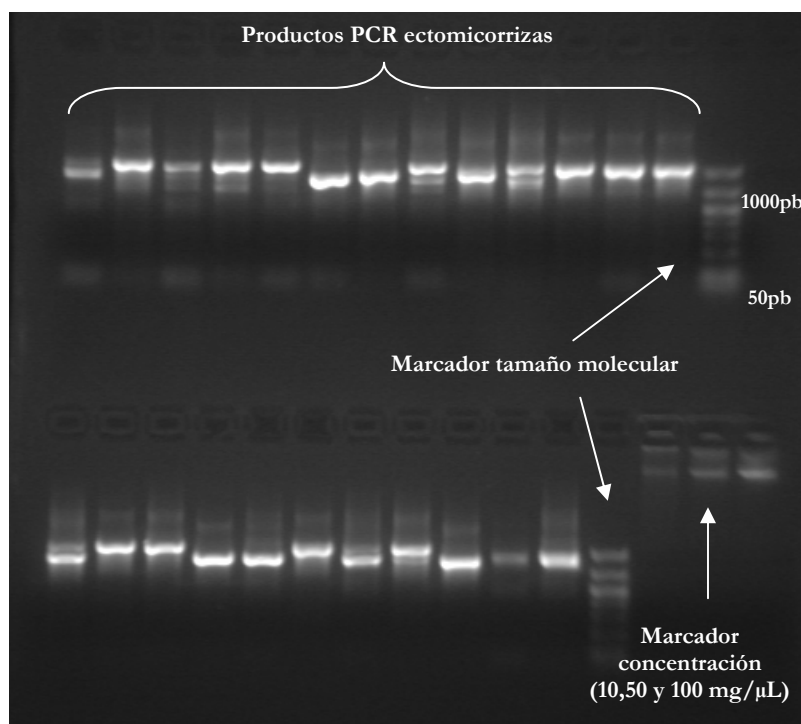


**Figura 27.** Dibujo esquemático de los diferentes tipos exploratorios representados por cortes transversales de las micorrizas y su micelio extramatricial (Agerer 2001). En la imagen se muestra la ausencia (Rh-) o presencia y el tipo de rizomorfos presentes en cada tipo exploratorio.

- 1) Contacto (Rh-): *Russula ochroleuca*, *Lactarius badiusanguineus*.
- 2) Corta distancia (Rh-): *Cenococcum geophyllum*, *Craterellus tubaeformis*, *Inocybe terrigera*, *Tuber melanosporum*.
- 3a) Media distancia, subtipo flecos (Rh A, C, D): *Cortinarius malachius*, *Dermocybe palustris*, *Tricholoma auratum*.
- 3b) Media distancia, subtipo enmarañado (Rh A, C, D): *Bankera fuligineo-alba*.
- 3c) Media distancia, subtipo liso (Rh B, C, D, E): *Cantharellus cibarius*, *Thelephora terrestris*, *Tomentellopsis submollis*.
- 4) Larga distancia (Rh F): *Amanita citrina*, *Xerocomus badius*, *Rhizopogon luteolus*, *Suillus bovinus*, *Scleroderma citrinum*.
- 5) *Pick-a-back* (Rh-, A (D, F)): representa micorrizas e hifas que entran en contacto y se introducen en rizomorfos de micorrizas de tipo exploratorio de larga distancia. Algunos ejemplos son *Chroogomphus rutilus* y *Gomphidius roseus*.

### 2.3.6. Análisis molecular de la ectomicorrizas

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit de extracción específico para hongos, el EZNA Fungal DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las muestras de ADN extraídas fueron analizadas mediante electroforesis, a 60V durante 15 minutos, en un minigel de agarosa (1,5%) añadiendo 1  $\mu$ L de bromuro de etidio. En el gel se utilizan dos marcadores de referencia: uno para estimar la concentración del ADN (ng/ $\mu$ L) (Fago Lambda, Sigma, USA) y el otro para determinar el tamaño molecular con un rango entre 100 y 1000 pares de bases (BioMarker Low, Bioventures, Inc., USA). La intensidad de las bandas obtenidas se visualizó mediante un transiluminador UV (Fig. 28).



**Figura 28.** Gel de agarosa con los productos de PCR de las ECM y dos marcadores de referencia, uno para determinar el tamaño molecular desde 50 pb hasta > 1000 pb y otro para estimar la concentración de ADN.

#### 2.3.6.1. Amplificación y secuenciación de ADN

Para la amplificación del ADN problema se realizó la PCR dos veces para cada muestra, utilizando dos parejas de cebadores: los cebadores universales ITS1/ITS4 para detectar hongos del phylum Ascomycota y una pareja específica para Basidiomycetes, los

ITS1F/ITS4B. La mix para la reacción de PCR estaba compuesta por 1  $\mu\text{L}$  de ADN extraído (rango de concentración 10-50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 23,8  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril, 3  $\mu\text{L}$  de 10X PCR buffer- $\text{MgCl}_2$ , 0,6  $\mu\text{L}$  de 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer y 0,6  $\mu\text{L}$  de enzima Taq polimerasa 1U/ $\mu\text{L}$  (BioTaq, Bioline, USA). El protocolo utilizado en el termociclador fue el siguiente: 94°C durante 3 min (1 ciclo); 94°C durante 30s, 55°C durante 30s y 72°C durante 1 min (40 ciclos); y 72°C durante 10 min (1 ciclo). El éxito de la amplificación se verificó mediante electroforesis con un minigel de agarosa (1,5%) y 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio a 60V durante 30 min. En todos los casos en donde la amplificación falló o la banda obtenida fue muy débil o doble, el ADN fue amplificado de nuevo después de haber sido sometido a una purificación utilizando el kit PowerClean DNA Clean-Up Kit (MoBio Laboratories, USA) para eliminar los compuestos inhibidores de la PCR.

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a MacroGen Laboratories ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) para ser purificados de los restos de primers y dNTPs y luego secuenciados con los primers correspondientes.

#### 2.3.6.2. Identificación de las especies

Para examinar las secuencias y corregirlas se utilizaron dos programas: BioEdit (versión 7.0.8, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y SeqMan™ (DNASTar, Madison, Wisconsin, USA). Ambos software permiten hacer el alineamiento de la secuencia del primer “*forward*” y del primer “*reverse*” para obtener una secuencia consenso final.

La secuencia consenso se utiliza para intentar identificar taxonómicamente el hongo a través de la comparación de la muestra problema con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank, a través del algoritmo de búsqueda nucleótido-nucleótido (blastn) BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), disponible a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI). También se ha utilizado la base de datos UNITE (<http://unite.ut.ee>), a través del algoritmo de búsqueda blastn, analizando las secuencias depositadas en el International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que reúne los datos de GenBank, del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y del DNA DataBank of Japan (DDBJ). Sólo se han tenido en cuenta las secuencias problema que presentaban entre el 90 y el 100% de similitud con otras secuencias almacenadas en las bases de datos. En concreto, las categorías taxonómicas fueron asignadas aplicando el siguiente criterio: para una similitud  $\geq 98\%$  se identifica la especie, mientras que para las secuencias con una similitud entre el 90% y el 97% se identifica sólo el género.

### 2.3.7. Parámetros ecológicos

Después del análisis morfológico y molecular de los ápices radicales micorrizados y la identificación de los carpóforos (setas), se calcularon una serie de parámetros ecológicos para caracterizar la comunidad de ECM y evaluar el efecto de los tratamientos.

#### 2.3.7.1. Abundancia y frecuencia relativa. Valor de importancia

La abundancia relativa refleja el número de carpóforos o de ápices micorrícicos de un género, dividido por el total de carpóforos o de ápices micorrizados.

$$Abundancia\ relativa = \frac{N^{\circ}\ \acute{a}pices\ micorrizados\ o\ carp\acute{o}foros\ por\ g\acute{e}nero}{N^{\circ}\ total\ \acute{a}pices\ micorrizados\ o\ carp\acute{o}foros}$$

La frecuencia absoluta de ápices micorrícicos o de carpóforos se calcula como el número de árboles en los que aparece cierto género dividido por el número total de árboles para cada tratamiento.

$$Frecuencia\ absoluta = \frac{N^{\circ}\ de\ \acute{a}rboles\ en\ los\ que\ aparece\ un\ g\acute{e}nero}{N^{\circ}\ total\ de\ \acute{a}rboles}$$

La frecuencia relativa es el cociente entre la frecuencia absoluta de un género y el sumatorio de las frecuencias absolutas de todos los géneros.

$$Frecuencia\ relativa = \frac{Frecuencia\ absoluta\ de\ un\ g\acute{e}nero}{\sum Frecuencias\ absolutas\ de\ todos\ los\ g\acute{e}neros}$$

El valor de importancia es un parámetro ecológico que evalúa la dominancia de ciertos hongos dentro de la comunidad (Horton & Bruns 2001). Se obtiene sumando los valores de abundancia relativa y frecuencia relativa de cada especie o género. Dado que abundancia y frecuencia miden aspectos diferentes de la autoecología de las especies, el valor de importancia es muy útil ya que da una idea más ponderada de las especies o géneros que dominan la comunidad. Las medidas de frecuencia resaltan a las especies o géneros que son comunes, aunque contribuyan poco al número total de individuos, mientras que las medidas de abundancia resaltan a las especies o géneros que forman agregados, aunque los hongos aparezcan de manera infrecuente.

$$Valor\ de\ importancia = Abundancia\ relativa + Frecuencia\ relativa$$

### 2.3.7.2. Proporción de especies con poca y mucha biomasa

Las micorrizas identificadas fueron repartidas en dos categorías (Saikkonen et al. 1999; Saravesi et al. 2008) en función de la biomasa que forman:

- ECM con poca biomasa: presentan un manto fúngico fino que rodea la raíz y con poco micelio asociado. No forman rizomorfos. Estas especies demandan poco carbono de la planta debido a su reducida biomasa.
- ECM con mucha biomasa: presentan un manto fúngico grueso que rodea la raíz y abundante micelio extramatricial asociado. Estas especies requieren mucho carbono para formar rizomorfos, micelio compacto, hifas y esclerocios. Suelen tener “tipos exploratorios” de larga distancia.

### 2.3.7.3. Riqueza y diversidad

La riqueza representa simplemente el número de géneros de hongos que aparecen asociados a cada árbol. El índice de diversidad tiene en cuenta la presencia de un taxón en la muestra y su abundancia relativa. El índice de diversidad de Shannon-Wiener es uno de los más usados en los estudios de comunidades ectomicorrícicas (Byrd et al. 2000; Grogan et al. 2000; Mah et al. 2001; Yamada & Katsuya 2001; Giachini et al. 2004; De Román & De Miguel 2005):

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

En la fórmula  $p_i$  es la abundancia relativa de la especie o tipo  $i$ .

### 2.3.8. Análisis estadísticos

Previamente a los análisis estadísticos todas las variables fueron analizadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si presentan una distribución normal y así determinar el test más adecuado.

Para analizar el efecto del tratamiento sobre los parámetros de crecimiento medidos en los árboles se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando las parcelas y los bloques como factores aleatorios. Ninguna transformación previa fue necesaria. Las comparaciones dos a dos se realizaron utilizando el test LSD (Least Significant Differences) de Fisher. La única variable que no se pudo analizar con este test fue el número de piñas. En este caso se



utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación dos a dos con un test U de Mann-Whitney.

Para determinar si el porcentaje de micorrización y la abundancia de ECM de mucha y poca biomasa varían entre tratamientos se utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando las parcelas y los bloques como factores aleatorios y los parámetros de crecimiento medidos en los árboles como covariables. Fue necesaria una transformación previa de los datos utilizando la fórmula  $\log_{10}(\sqrt{x})$ . Las comparaciones dos a dos se realizaron utilizando el test LSD.

Para analizar la riqueza se utilizó un modelo lineal mixto generalizado (generalized linear mixed model, GLMM) con distribución de Poisson y función *logarithm link*. Para analizar la diversidad de las especies se utilizó un GLMM con distribución normal y función *identity*, usando parcelas y bloques como factores aleatorios. El efecto del tratamiento sobre la abundancia de cada género encontrado en los ápices micorrizados se analizó con el coeficiente de correlación de Spearman.

Para estudiar el efecto del tratamiento sobre el número total de carpóforos y sobre su biomasa, se utilizó un ANCOVA, considerando los bloques y las parcelas como factores aleatorios y los parámetros de crecimiento medidos en los árboles como covariables, previa transformación mediante  $\log_{10}(x + 1)$ . La frecuencia de los carpóforos por árbol en la parcela B no fue suficiente para realizar el análisis de la riqueza y de la diversidad de especies. En la parcela A para analizar el efecto del tratamiento sobre la diversidad y riqueza de carpóforos en cada año se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución de Poisson y función *logarithm link*.

El nivel de significación ( $\alpha$ ) se estableció en  $P < 0.05$ . El software estadístico utilizado fue el GenStat 11.1 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, U.K.) y el STATISTICA 6 (Statsoft©, Tulsa, Oklahoma).

## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Variables de crecimiento de los árboles

Durante el 2007 el análisis de varianza no detectó ninguna diferencia entre los árboles pertenecientes a los distintos tratamientos en ambas parcelas (Tabla 11).

**Tabla 11.** Parámetros de crecimiento de los árboles durante 2007.

2007	Parcela A			Parcela B		
	Control	25%	75%	Control	25%	75%
Altura (m)	2,26±0,09(a)	2,25±0,11(a)	2,18±0,10(a)	2,28±0,07(a)	2,00±0,10(b)	1,94±0,10(b)
Diámetro tronco (cm)	4,12±0,30(a)	4,20±0,31(a)	3,85±0,30(a)	4,49±0,38(a)	3,97±0,33(a)	3,58±0,37(a)
Altura copa (m)	1,64±0,09(a)	1,65±0,10(a)	1,48±0,12(a)	1,42±0,06(a)	1,29±0,07(a)	1,22±0,07(a)
Diámetro copa (m)	1,19±0,04(ab)	1,32±0,09(a)	1,07±0,07(b)	1,21±0,05(a)	1,23±0,05(a)	1,22±0,06(a)
Número de brotes	121,7±9,15(ab)	156,8±17,71(a)	112,4±15,29(b)	167,4±13,09(a)	181,3±16,7(a)	153,3±11,47(a)
Long. brote principal (cm)	15,63±2,70(a)	17,07±1,50(a)	18,17±1,80(a)	13,95±1,85(a)	9,87±1,84(a)	9,40±1,46(a)
Long. brotes 1 <sup>er</sup> verticilo (cm)	11,92±1,30(a)	12,41±1,10(a)	11,35±1,30(a)	9,66±0,80(a)	7,97±1,30(a)	8,08±1,20(a)
Long. brotes 2 <sup>o</sup> verticilo (cm)	7,68±0,95(a)	8,56±0,84(a)	7,72±1,00(a)	7,19±0,80(a)	6,90±1,25(a)	6,41±0,75(a)
Long. brotes 3 <sup>er</sup> verticilo (cm)	3,69±0,33(a)	3,87±0,47(a)	3,97±0,55(a)	4,56±0,58(a)	4,60±0,55(a)	4,63±0,38(a)
Long. acículas (cm)	15,30±0,56(a)	15,30±0,71(a)	15,29±0,57(a)	12,58±0,74(a)	11,53±0,65(a)	11,38±0,55(a)
Número de piñas	0,53±0,22(a)	0,53±0,19(a)	0,73±0,25(a)	4,73±0,82(a)	6,20±1,51(a)	4,40±1,40(a)

Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada localidad ( $P < 0.05$ ).

Sin embargo en el 2008, la defoliación disminuyó significativamente el crecimiento de las plantas (Tabla 12). Se ha encontrado un efecto negativo sobre la altura del árbol ( $F_{2,79} = 3.47$ ,  $P = 0.036$ ), el diámetro del tronco ( $F_{2,79} = 5.11$ ,  $P = 0.008$ ), el número de brotes ( $F_{2,79} = 3.83$ ,  $P = 0.026$ ), la longitud media de los brotes principales del primer verticilo ( $F_{2,79} = 4.90$ ,  $P = 0.010$ ), del segundo verticilo ( $F_{2,79} = 3.34$ ,  $P = 0.041$ ) y del tercer verticilo ( $F_{2,79} = 5.33$ ,  $P = 0.007$ ). Por otra parte, la defoliación afectó débilmente a la altura de la copa ( $F_{2,79} = 2.54$ ,  $P = 0.085$ ), a la longitud del brote terminal principal ( $F_{2,79} = 2.98$ ,  $P = 0.057$ ) y a la longitud de las acículas ( $F_{2,79} = 2.27$ ,  $P = 0.110$ ), mientras que no afectó al diámetro de copa ( $F_{2,79} = 1.47$ ,  $P = 0.236$ ) y al número de piñas (Kruskal-Wallis = 0.814,  $P = 0.666$ ).

**Tabla 12.** Parámetros de crecimiento de los árboles durante 2008.

2008	Parcela A			Parcela B		
	Control	25%	75%	Control	25%	75%
Altura (m)	3,26±0,15(a)	3,23±0,14(a)	3,09±0,13(a)	2,70±0,19(a)	2,35±0,14(b)	2,15±0,15(b)
Diámetro tronco (cm)	6,74±0,43(a)	6,99±0,52(a)	5,74±0,37(b)	6,52±0,45(a)	5,47±0,45(b)	4,71±0,54(b)
Altura copa (m)	2,51±0,15(a)	2,63±0,15(a)	2,35±0,15(a)	1,76±0,09(a)	1,50±0,19(ab)	1,37±0,11(b)
Diámetro copa (m)	1,75±0,05(ab)	1,85±0,09(a)	1,64±0,08(b)	1,59±0,04(a)	1,54±0,04(a)	1,54±0,06(a)
Número de brotes	192,3±18,3(b)	253,0±30,3(a)	149,5±15,1(c)	185,9±16,1(a)	209,5±12,2(a)	218,0±21,4(a)
Long. brote principal (cm)	36,03±3,30(a)	34,23±3,04(a)	30,29±3,12(a)	18,10±2,88(a)	10,84±2,89(b)	10,25±2,00(b)
Long. brotes 1 <sup>er</sup> verticilo (cm)	26,04±2,80(a)	24,99±2,40(a)	18,35±2,10(b)	11,75±1,80(a)	9,40±1,30(ab)	7,68±1,00(b)
Long. brotes 2 <sup>o</sup> verticilo (cm)	23,45±3,00(a)	23,45±2,20(a)	16,19±2,26(b)	8,37±1,15(a)	8,31±1,36(a)	6,99±1,44(a)
Long. brotes 3 <sup>er</sup> verticilo (cm)	13,04±2,29(a)	17,47±2,30(a)	9,41±1,27(b)	7,13±1,11(a)	7,06±1,60(ab)	5,03±0,70(b)
Long. acículas (cm)	19,38±0,65(a)	18,47±0,60(ab)	17,90±0,37(a)	14,27±0,73(a)	13,66±1,04(ab)	13,07±0,42(b)
Número de piñas	1,00±0,28(a)	2,87±0,77(b)	2,47±0,52(b)	7,47±1,49(a)	6,64±1,68(a)	7,31±2,28(a)

Las letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada localidad ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4.2. Caracterización de la comunidad de ectomicorrizas

Para cada árbol se diferenciaron los morfotipos presentes en sus raíces, clasificando morfológicamente un total de 419 morfotipos. Aunque un mismo morfotipo se repitiera en varias raíces fue igualmente caracterizado y descrito, ya que es conocido que diferentes especies de micorrizas pueden parecerse morfológicamente entre ellas y una misma especie puede presentar diferente color y morfología según su planta hospedadora, el tipo de suelo y la edad.

El análisis molecular se realizó para un total 323 morfotipos, ya que gracias a la experiencia adquirida en el transcurso del estudio, los otros morfotipos fueron clasificados taxonómicamente sin dificultades.

Durante el 2007 se analizaron y clasificaron 226 morfotipos repartidas luego en 15 géneros. En el 2008 se analizaron y clasificaron 193 morfotipos agrupados finalmente en 17 géneros. A continuación aparece la lista de los taxones identificados. Las especies entre paréntesis son solo hipotéticas, ya que el análisis molecular no llegó a determinar exactamente su identidad.

### 2007

- Género Entoloma: *Entoloma conferendum*
- Género Gomphidius: *Gomphidius* sp. (*roseous*)
- Género Inocybe: *Inocybe praetervisa*
- Género Lactarius: *Lactarius rufus*, *Lactarius subdulcis* y *Lactarius* sp. (*hepaticus*)
- Género Meliniomyces: *Meliniomyces* sp. (*variabilis*)
- Género Paxillus: *Paxillus involutus*
- Género Phialophora: *Phialophora* sp. (*finlandia*)
- Género Pseudotomentella: *Pseudotomentella tristis* y *Pseudotomentella* sp. (*mucidula*)
- Género Scleroderma: *Scleroderma* sp. (*citrinum*)
- Género Suillus: *Suillus bovinus*
- Género Thelephora: *Thelephora terrestris*
- Género Tomentella: *Tomentella sublilacina*
- Género Tomentellopsis: *Tomentellopsis* sp. (*submollis*)
- Género Rhizopogon: *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon verii* y *Rhizopogon* sp. (*subpurpurascens*)
- Género Russula: *Russula drimeia* y *Russula ochroleuca*

### 2008

- Género Boletus: *Boletus aestivalis*
- Género Entoloma: *Entoloma conferendum*
- Género Inocybe: *Inocybe praetervisa*, *Inocybe* sp. (*jacobi*)
- Género Lactarius: *Lactarius rufus*
- Género Paxillus: *Paxillus involutus*
- Género Pseudotomentella: *Pseudotomentella tristis*
- Género Rhizopogon: *Rhizopogon luteolus* y *Rhizopogon* sp. (*roseolus*)

- Género *Russula*: *Russula drimea*
- Género *Scleroderma*: *Scleroderma citrinum*
- Género *Suillus*: *Suillus bovinus*
- Género *Thelephora*: *Thelephora terrestris*
- Género *Tomentella*: *Tomentella sublilacina*, *Tomentella* sp. (*atramentaria*)
- Género *Tomentellopsis*: *Tomentellopsis* sp. (*submollis*)
- Género *Xerocomus*: *Xerocomus badius*
- ECM 1: ectomicorriza no identificada (Ascomycota)
- ECM 2: ectomicorriza no identificada (Ascomycota)
- ECM 3: ectomicorriza no identificada (Basidiomycota)
- ECM 4: ectomicorriza no identificada (Basidiomycota)

También se encontraron los hongos *Cryptococcus podzolicus*, *Cryptococcus* sp. y *Mycena* sp. que no se incluyeron en el análisis por ser especies saprófitas del suelo que no forman ECM.

#### 2.4.2.1. Análisis molecular de las ectomicorizas

En la Tabla 13 aparecen los resultados del análisis molecular de las muestras de ápices micorrizados extraídos durante 2007 y 2008. En la primera columna se indica el número de acceso de las secuencias depositadas en la base de datos GenBank y en la segunda columna la longitud de la cadena (pb = pares de bases). En las columnas sucesivas se indica el taxón encontrado y su número de acceso, el phylum (Ascomycota o Basidiomycota), el año y la parcela en donde fueron encontrados. También se muestran otros parámetros utilizados por GenBank, como el % de similitud y el *query coverage*. La similitud proporciona un valor numérico del grado de parecido entre la secuencia problema y la secuencia encontrada en la base de datos. El *query coverage* indica en porcentaje, la longitud de la secuencia problema complementaria a la secuencia encontrada en las base de datos. Otro dato importante es el *E value*, que a través de la aplicación de un modelo estadístico, indica la probabilidad de que la similitud encontrada entre la secuencia problema y la secuencia encontrada en la base de datos se deba al azar, y no a una homología real. Para el presente estudio sólo se han tenido en cuenta los resultados que presentaban un *E value* igual a cero.

La secuenciación de 323 muestras permitió identificar un total de 19 géneros. Cuatro ECM quedaron sin identificar (Tabla 13). De estos sólo 17 géneros han sido confirmados como ECM (15 Basidiomycetes y 2 Ascomycetes). Comparando estos resultados con la revisión

bibliográfica de las especies fúngicas asociadas con *P. pinaster* que aparecen en artículos publicados entre 1922 y 2006 (Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009), se han encontrado 5 géneros (*Tomentella*, *Pseudotomentella*, *Tomentellopsis*, *Phialophora* y *Meliniomyces*) y 8 especies (*Boletus aestivalis*, *Entoloma conferendum*, *Inocybe praetervisa*, *Pseudotomentella tristis*, *Tomentella sublilacina*, *Rhizopogon verii*, *Russula drimeia* y *Russula ochroleuca*.) que nunca habían sido descritas en asociación con *P. pinaster*.

**Tabla 13.** Resultados del análisis molecular de las muestras de ápices micorrizados extraídos durante 2007 y 2008.

Número de Acceso	Longitud (pb)	Identificación Blast <sup>b</sup>	Phylum	Similitud	Query coverage	ECM Biomasa	Año	Parcela
FJ816721	728	<i>Boletus aestivalis</i> (AY130295)	B	99	100	M	2008	A
FJ816722	674	<i>Cryptococcus podzolicus</i> (AJ581036)	B	99	79		2007	A
FJ816723	676	<i>Cryptococcus</i> sp. (AY254865)	B	99	95		2007	A,B
FJ816724	588	<i>Entoloma conferendum</i> (AF538624)	B	98	99	P	2007-2008	A
FJ816725	843	<i>Gomphidius</i> sp. (DQ534570)	B	94	74	P	2007	A,B
FJ816726	566	<i>Inocybe</i> sp. (AM882710)	B	95	88	P	2008	B
FJ816727	534	<i>Inocybe praetervisa</i> (AM882720)	B	99	91	P	2007-2008	B
FJ816728	617	<i>Lactarius</i> sp. (AF096989)	B	97	95	P	2007	A
FJ816729	777	<i>Lactarius rufus</i> (EF685089)	B	99	99	P	2007	B
FJ816730	402	<i>Lactarius rufus</i> (EF493296)	B	100	100	P	2008	B
FJ816731	841	<i>Lactarius subdulcis</i> (AJ889963)	B	98	99	P	2007	A
FJ816732	531	<i>Meliniumyces</i> sp. (EF093171)	A	97	99	P	2007	A
FJ816733	757	<i>Mycena</i> sp. (EF530939)	B	93	70		2007	B
FJ816734	674	<i>Paxillus involutus</i> (EU819416)	B	98	100	M	2007-2008	A
FJ816735	438	<i>Paxillus</i> sp. (EU078736)	B	96	99	M	2008	A
FJ816736	833	<i>Paxillus involutus</i> (EU486436)	B	98	99	M	2007	A
FJ816737	530	<i>Phialophora</i> sp. (DQ069046)	A	91	96	P	2007	A
FJ816738	660	<i>Pseudotomentella</i> sp. (AF274769)	B	92	87	P	2007	A
FJ816739	590	<i>Pseudotomentella tristis</i> (AJ889968)	B	100	100	P	2007-2008	A
FJ816740	715	<i>Pseudotomentella tristis</i> (AJ889979)	B	99	87	P	2007	A
FJ816741	477	<i>Rhizopogon</i> sp. (EU784397)	B	95	100	M	2007	B
FJ816742	757	<i>Rhizopogon luteolus</i> (EU379676)	B	99	100	M	2007-2008	A,B
FJ816743	497	<i>Rhizopogon</i> sp. (EU379678)	B	96	98	M	2008	B
FJ816744	622	<i>Rhizopogon</i> sp. (EU669318)	B	94	96	M	2007	B
FJ816745	912	<i>Rhizopogon verii</i> (AM085531)	B	99	85	M	2007	B
FJ816746	584	<i>Russula drimeia</i> (EU557320)	B	99	100	P	2007-2008	A
FJ816747	483	<i>Russula drimeia</i> (AY061672)	B	99	99	P	2007-2008	A
FJ816748	846	<i>Russula ochroleuca</i> (AY254880)	B	99	90	P	2007	A
FJ816749	643	<i>Russula ochroleuca</i> (AM113964)	B	99	100	P	2007	A
FJ816750	653	<i>Scleroderma citrinum</i> (EU784414)	B	100	99	M	2007-2008	A

Número de Acceso	Longitud (pb)	Identificación Blast <sup>b</sup>	Phylum	Similitud	Query coverage	ECM Biomasa	Año	Parcela
FJ816751	800	<i>Suillus bovinus</i> (AB036902)	B	98	99	M	2007	A
FJ816752	655	<i>Suillus bovinus</i> (DQ068967)	B	100	100	M	2008	A,B
FJ816753	643	<i>Suillus bovinus</i> (EU379677)	B	99	100	M	2008	A
FJ816754	668	<i>Suillus bovinus</i> (AJ272404)	B	99	100	M	2008	A
FJ816755	804	<i>Suillus bovinus</i> (AY898623)	B	99	94	M	2007	A,B
FJ816756	795	<i>Thelephora</i> sp. (DQ482000)	B	96	97	M	2007	B
FJ816757	624	<i>Thelephora terrestris</i> (DQ068970)	B	99	99	P	2007-2008	A
FJ816758	610	<i>Thelephora terrestris</i> (EU427330)	B	100	100	P	2007-2008	A,B
FJ816759	528	<i>Thelephora terrestris</i> (FJ532478)	B	99	99	P	2008	B
FJ816760	412	<i>Thelephora terrestris</i> (U83486)	B	98	100	P	2007	B
FJ816761	671	<i>Thelephora terrestris</i> (DQ822828)	B	98	100	P	2007	A,B
FJ816762	768	<i>Thelephora</i> sp. (EF655695)	B	92	96	P	2007	B
FJ816763	568	<i>Thelephora terrestris</i> (AY230244)	B	98	99	P	2008	B
FJ816764	568	<i>Tomentella</i> sp. (DQ974772)	B	95	98	P	2008	B
FJ816765	814	<i>Tomentella</i> sp. (EF218830)	B	96	99	P	2007	A
FJ816766	444	<i>Tomentella subilacina</i> (AF272935)	B	99	98	P	2008	A
FJ816767	609	<i>Tomentella subilacina</i> (AJ889976)	B	98	99	P	2007	A
FJ816768	627	<i>Tomentella subilacina</i> (AJ889982)	B	97	99	P	2008	A
FJ816769	614	<i>Tomentella subilacina</i> (AM087267)	B	98	99	P	2008	A
FJ816770	767	<i>Tomentella</i> sp. (DQ482004)	B	96	97	P	2007	A
FJ816771	765	<i>Tomentella</i> sp. (DQ482015)	B	96	99	P	2007	A
FJ816772	509	<i>Tomentella</i> sp. (DQ482017)	B	96	100	P	2007	A
FJ816773	778	<i>Tomentella</i> sp. (DQ822833)	B	97	98	P	2007	A
FJ816774	610	<i>Tomentellopsis</i> sp. (AM086447)	B	96	100	M	2007-2008	A
FJ816775	790	<i>Tomentellopsis</i> sp. (AY641459)	B	96	98	M	2007	A
FJ816776	508	Uncultured ECM 1 (DQ069004)	A	99	97		2008	A,B
FJ816777	453	Uncultured ECM 2 (FJ013071)	A	98	99		2008	A
FJ816778	571	Uncultured ECM 3 (AJ630027)	B	99	87		2008	A
FJ816779	549	Uncultured ECM 4 (FJ013075)	B	99	99		2008	A,B
FJ816780	608	<i>Xerocomus badius</i> (AJ889926)	B	99	100	M	2008	A

A, Ascomycota y B, Basidiomycota. M, ECM con mucha biomasa y P, ECM con poca biomasa.



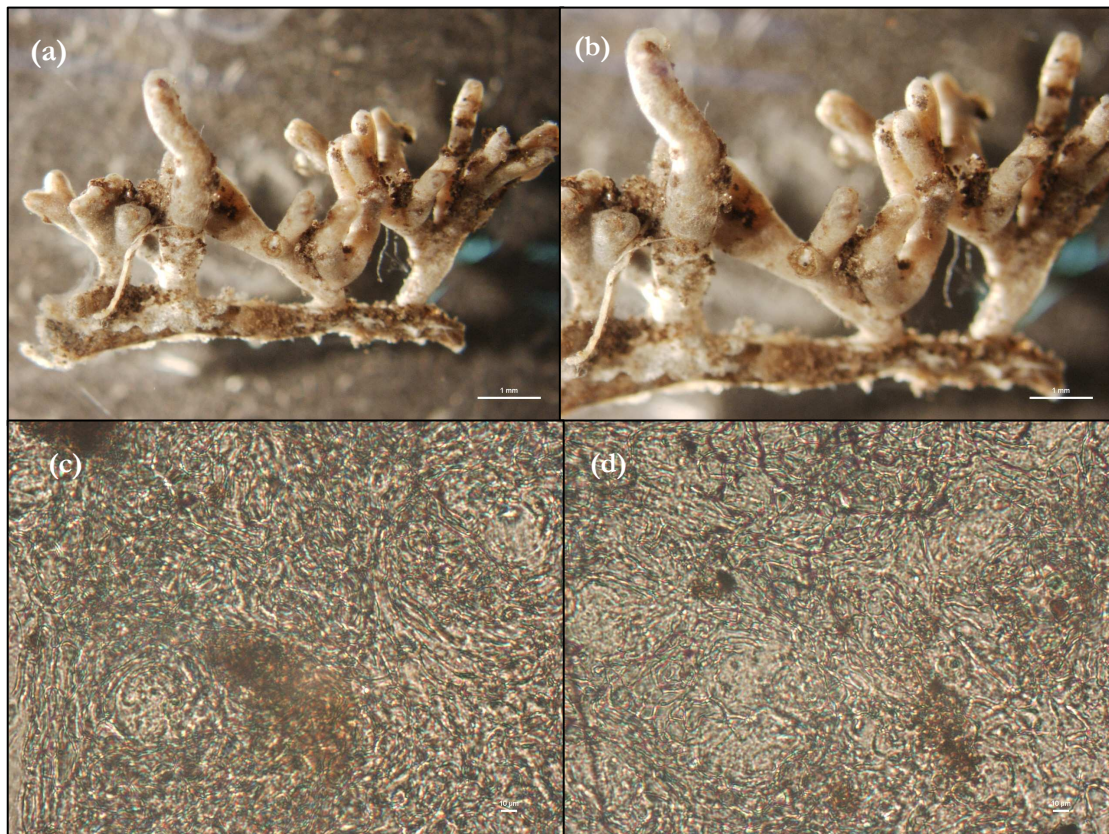
#### 2.4.2.2. Caracterización morfológica de las principales especies de micorrizas

A continuación se muestra una descripción de los caracteres morfológicos y anatómicos de las principales especies de ECM identificadas a través del análisis morfológico y molecular.

- ***Boletus aestivalis* (Paulet) Fr.**

**Características morfológicas:** micorriza de color blanco con aspecto sinuoso y fibroso (Fig. 29). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura y estriada. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 1 y 4 mm y un diámetro del eje principal entre 0,50 y 0,65 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud de 0,3-3,0 mm y un diámetro de 0,30-0,60 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es blanquecina, con el ápice cilíndrico desde liso a tortuoso. Las hifas que emanan son escasas, sin embargo presenta rizomorfos.

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático de color blanquecino con hifas curvadas formando anillos (Tipo A).



**Figura 29.** *Boletus aestivalis*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Manto, barra 10 µm (c,d).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas y sinuosas sin una distribución específica. Los rizomorfos son cilíndricos y blanquecinos. Debido a la escasez de la muestra no se pudo realizar la descripción del tipo de rizomorfos. Lo más habitual en el género *Boletus* es que los rizomorfos sean altamente diferenciados (Tipo E o F) (Agerer 2006). Debido a la cantidad y las características de los elementos que emanan del manto, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.

**Comentarios:** esta especie se ha encontrado asociada a un solo árbol. Macroscópicamente se puede confundir con otras especies que presentan superficie blanquecina, como por ejemplo *Paxillus involutus*, *Scleroderma citrinum*, *Suillus bovinus* o *Xerocomus badius*.

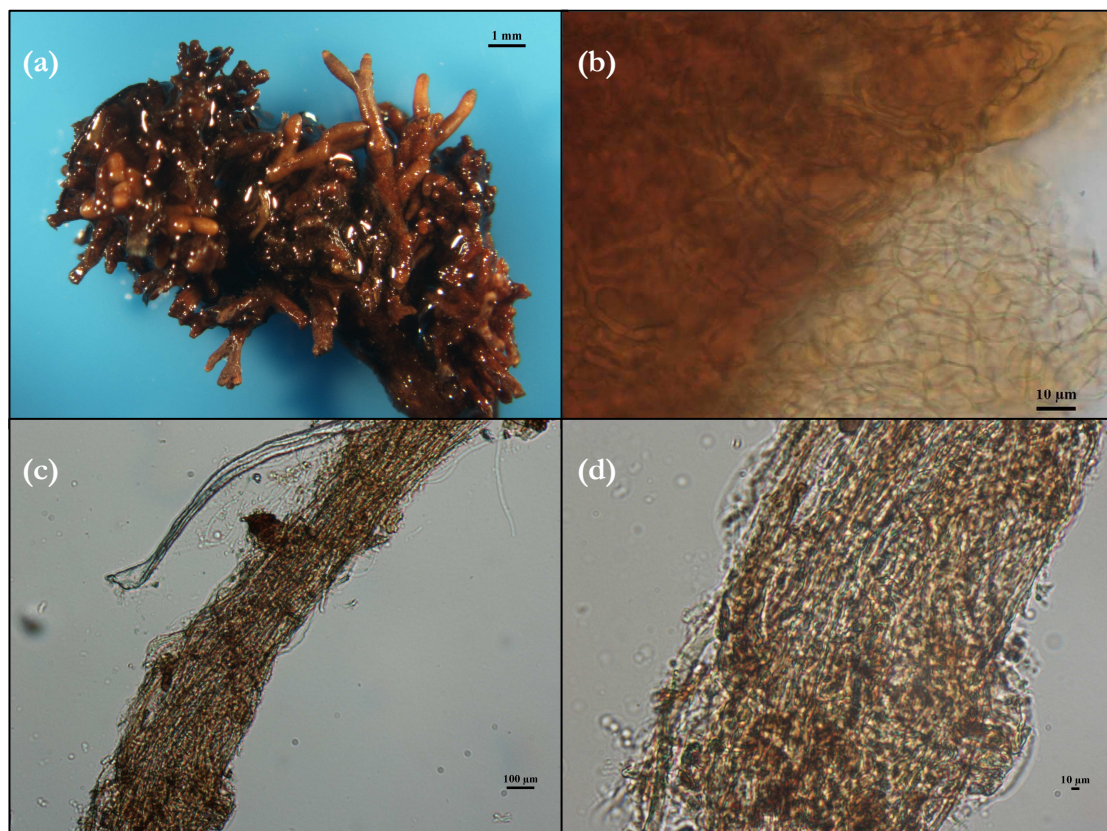
- ***Lactarius subdulcis* Bull. : Fr.**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón-anaranjado (Fig. 30). No presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 1,2 y 4,7 mm y un diámetro del eje principal entre 0,40 y 0,70 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,4 y 2,0 mm y un diámetro entre 0,30 y 0,50 mm, y su superficie es lisa y brillante. Los ápices son cilíndricos, hinchados y lisos, aunque en ocasiones están constreñidos. La coloración de las partes viejas es marrón oscura. Las hifas que emanan y rizomorfos son escasos. Ausencia de cistidios.

**Características anatómicas del manto:** manto pseudoparenquimático con células angulares sobre las que se dispone una ligera red de hifas (Tipo P). El diámetro de las células angulares varía entre 4,2 y 10,8  $\mu\text{m}$ .

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas. Los rizomorfos son también escasos, de color blanquecino, conectados con el manto en puntos restringidos y no diferenciados, con hifas uniformes densamente entretrejidas (Tipo B). El diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,02 y 0,04 mm. Ausencia de cistidios. Debido a la escasa presencia de hifas y de rizomorfos, el tipo exploratorio de esta especie es de media distancia subtipo liso.

**Comentarios:** macroscópicamente puede ser confundida con otras especies de color marrón, tal como *Tomentella sublilacina*. Se diferencian microscópicamente por el tipo de manto que en *T. sublilacina* presenta células en puzzle sobre las que se dispone una ligera red de hifas (Tipo Q), mientras que en esta especie presenta células angulares con una ligera red de hifas (Tipo P).

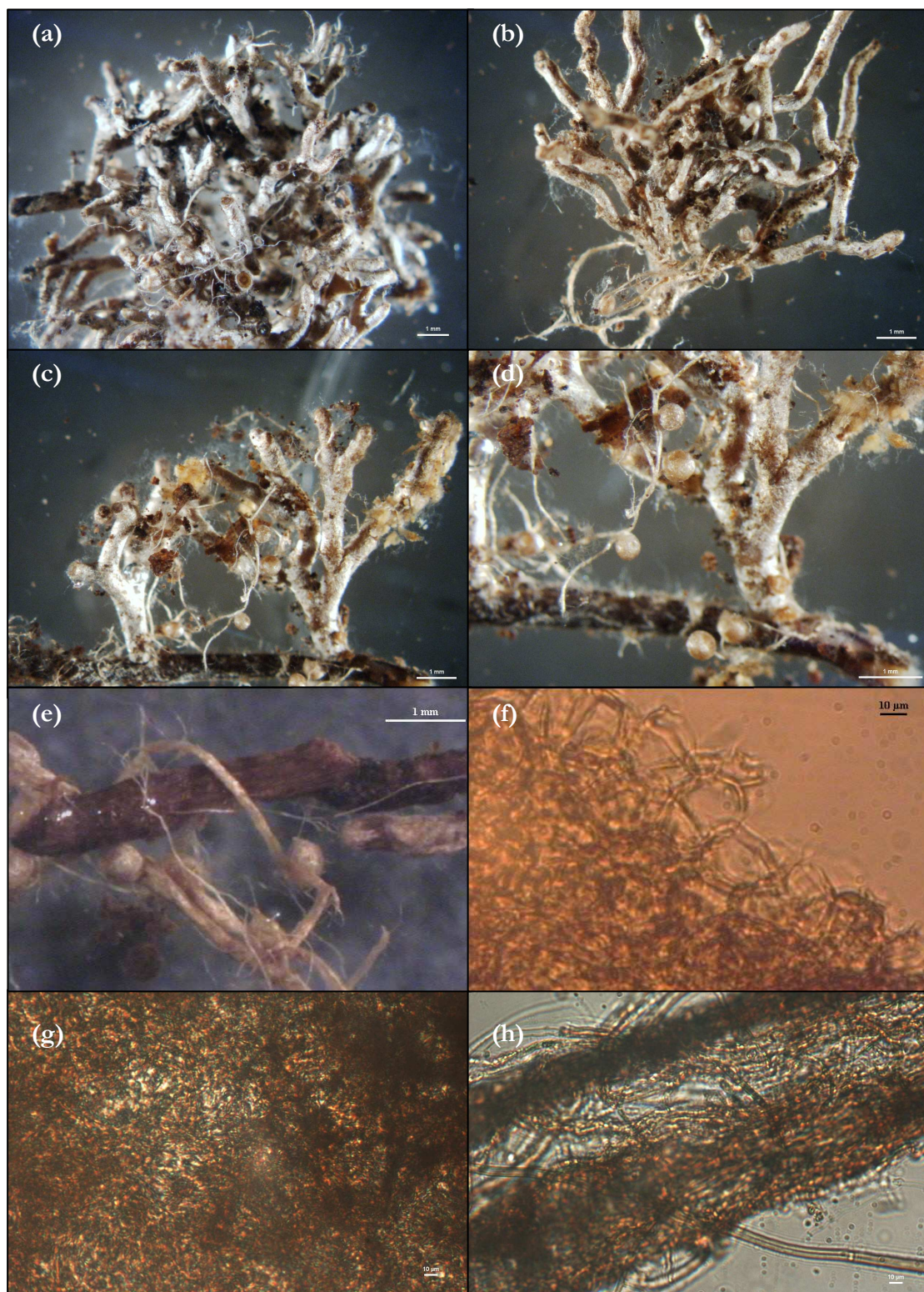


**Figura 30.** *Lactarius subdulcis*. Micorriza, barra 1 mm (a). Manto, barra 10 µm (b). Rizomorfo, barra 100 µm (c) y 10 µm (d).

- ***Paxillus involutus* (Batsch) Fr.**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón, con superficie blanca y aspecto sinuoso y fibroso (Fig. 31). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura y estriada. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 1,0 y 7,5 mm y un diámetro del eje principal entre 0,30 y 0,65 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,5 y 4,5 mm y un diámetro entre 0,35 y 0,45 mm. La superficie de estas terminaciones es marrón, con superficie laxa, blanquecina, más o menos compacta, y con el ápice cilíndrico con aspecto deshidratado,

desde liso a tortuoso. Las hifas que emanan son escasas. Se aprecian rizomorfos, esclerocios y cistidios.



**Figura 31.** *Paxillus involutus*. Micorriza, donde aparecen los rizomorfos y los esclerocios, barra 1 mm (a-d). Detalle de los rizomorfos y esclerocios, barra 1 mm (e). Estructura interna de un esclerocio, barra 10  $\mu\text{m}$  (f). Manto, barra 10  $\mu\text{m}$  (g). Rizomorfo, barra 10  $\mu\text{m}$  (h).

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático de color amarillento, con hifas distribuidas de forma irregular sin un patrón determinado (Tipo B).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas y sinuosas sin una distribución específica. Los rizomorfos son cilíndricos, blanquecinos y altamente diferenciados (Tipo F). Los rizomorfos crecen a partir del extremo de los ápices de la raíz y pueden ser abundantes o estar del todo ausentes en algunas muestras. Se observan abundantes hifas que emanan, con presencia de fíbulas. El diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,10 y 0,25 mm. Escasos cistidios globulares (Tipo G). Presencia de esclerocios globulares del mismo color que los rizomorfos, con un diámetro que varía entre 0,4 y 0,5 mm y localizados sobre los rizomorfos. Los esclerocios presentan una estructura interna pseudoparenquimatosa formada por células redondeadas entre 15 y 30  $\mu\text{m}$ . Debido a la cantidad y tipo de elementos que emanan del manto, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.

**Comentarios:** La característica morfológica macroscópica más significativa de esta micorriza es la presencia de rizomorfos y esclerocios, aunque en algunas muestras no aparecen. Se puede confundir con otras especies que presentan superficie blanquecina, tal como *Scleroderma citrinum*, *Boletus aestivalis*, *Suillus bovinus* o *Xerocomus badius*. Sin embargo se pueden distinguir fácilmente entre ellas a nivel microscópico por el tipo de manto, ya que sólo *P. involutus* presenta el manto de tipo B, y por que las otras micorrizas poseen rizomorfos más complejos.

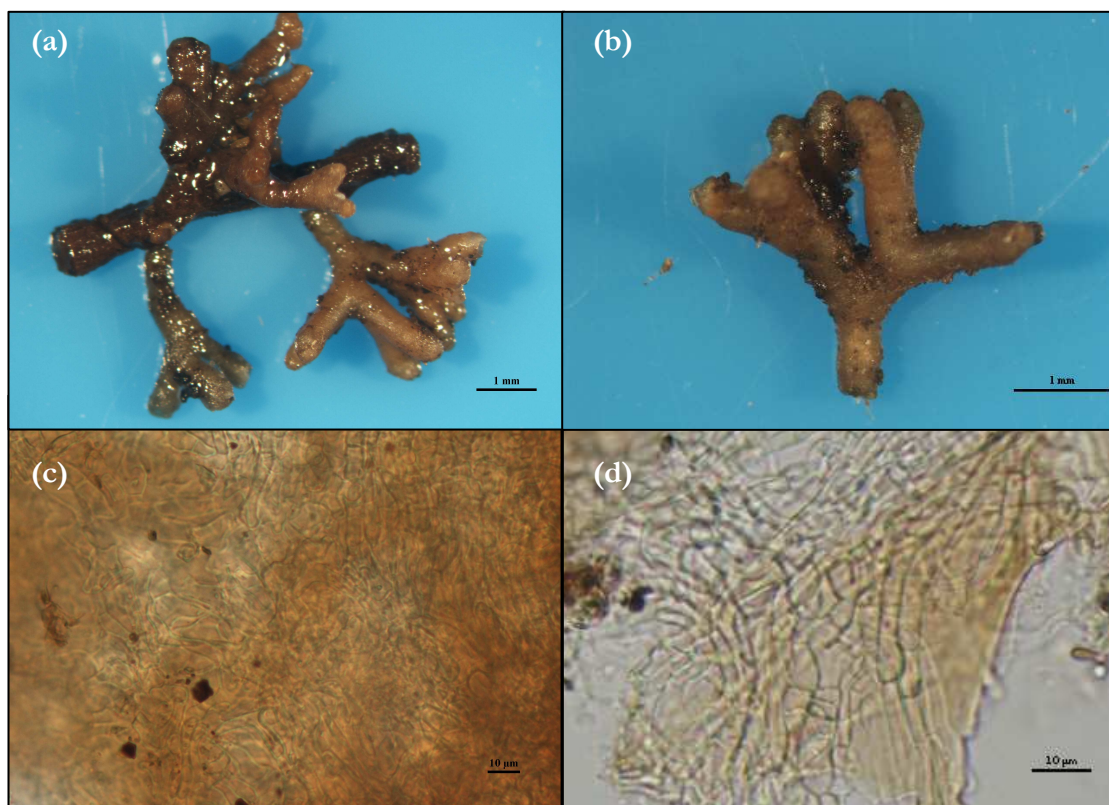
- *Pseudotomentella tristis* (P. Karst.) M. J. Larsen

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro que se vuelve oscuro en las partes viejas (Fig. 32). Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 2,1 y 3,4 mm y un diámetro del eje principal entre 0,45 y 0,60 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,40 y 1,00 mm y un diámetro entre 0,36 y 0,47 mm, y una superficie viscosa y brillante, con partículas de suelo adheridas. Los ápices son cilíndricos y lisos, y en ocasiones aparecen constreñidos. Las hifas que emanan son escasas. Ausencia de rizomorfos y cistidios.

**Características anatómicas del manto:** manto plectenquimático no diferenciado, con hifas densamente entrelazadas distribuidas de forma irregular (Tipo B). Las hifas presentan ensanchamientos, y un diámetro que oscila entre 2,9 y 5,2  $\mu\text{m}$ .

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas. Los rizomorfos son también escasos y de color blanquecino, conectados con el manto en puntos restringidos y no diferenciados, constituidos por hifas uniformes densamente entrelazadas (Tipo B). El diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,02 y 0,32 mm. Ausencia de cistidios. Debido a la escasez de hifas y a la ausencia de rizomorfos, el tipo exploratorio es de contacto.

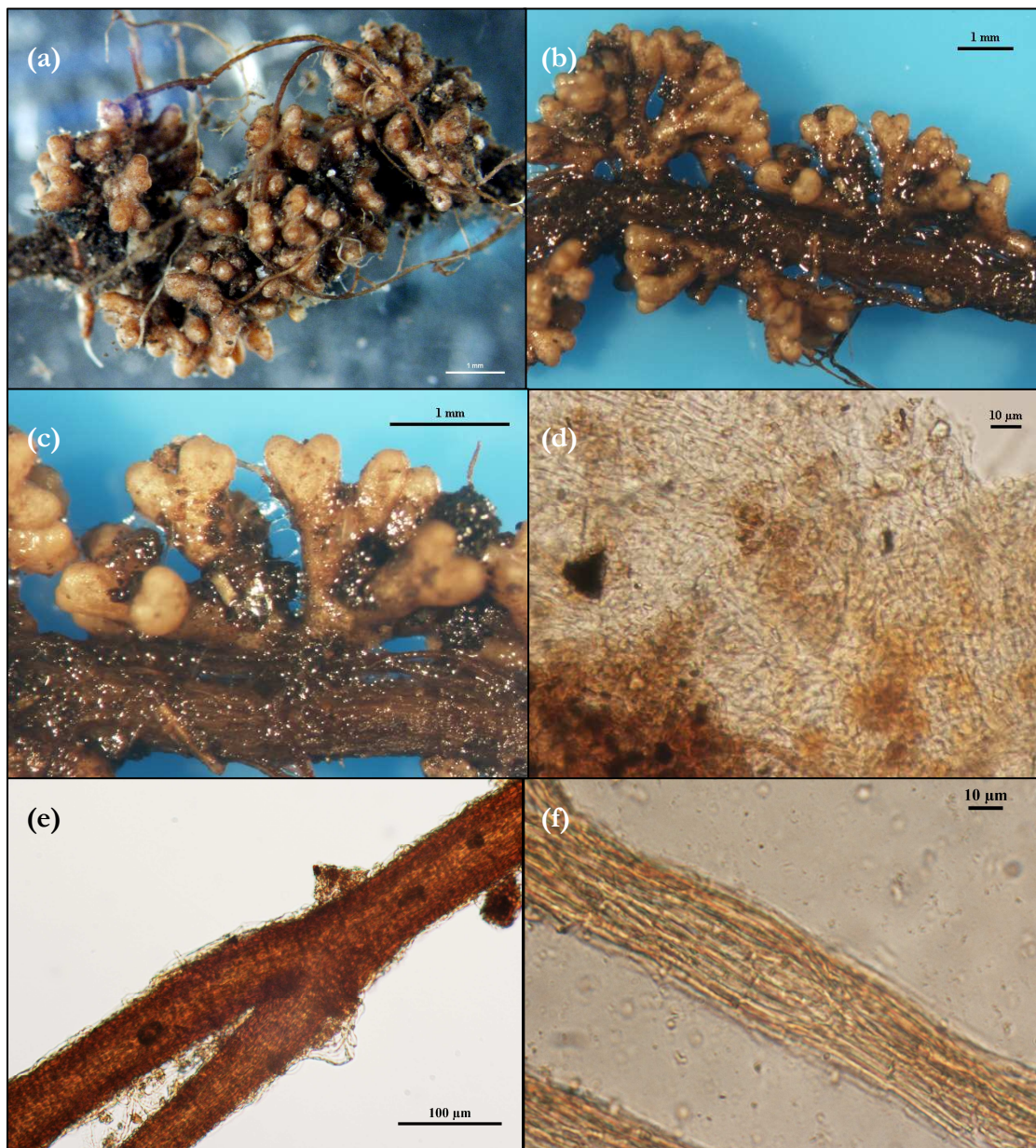
**Comentarios:** se diferencia a nivel macroscópico de otras micorrizas marrones por su superficie muy viscosa y con partículas de tierra adheridas.



**Figura 32.** *Pseudotomentella tristis*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Manto, barra 10  $\mu\text{m}$  (c,d).

- *Rhizopogon luteolus* Fr.

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro (ocre). Las partes viejas presentan coloración marrón blanquecina (Fig. 33). Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma o coraloide, una longitud que oscila entre 1,5 a 2,5 mm y un diámetro del eje principal entre 0,38 a 0,75 mm. Las terminaciones no ramificadas son rectas y cilíndricas, tienen una longitud entre 0,20 y 0,72 mm y un diámetro entre 0,30 y 0,45 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es de color marrón claro, con superficie algodonosa. Ausencia de hifas que emanan del manto y presencia de abundantes rizomorfos de color marrón oscuro.



**Figura 33.** *Rhizopogon luteolus*. Micorriza, barra 1 mm (a-c). Manto, barra 10 µm (d). Rizomorfo, barra 100 µm (e) y 10 µm (f).

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático con hifas de aspecto ramificado y retorcido que forman una red (Tipo E).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** ausencia de hifas que emanan del manto y cistidios. Presencia de abundantes rizomorfos cilíndricos de color marrón oscuro. Los rizomorfos son diferenciados, presentan hifas centrales ensanchadas (Tipo F), y su diámetro oscila entre 0,05 y 0,25 mm. También presentan ramificaciones y están conectados al manto por puntos restringidos. Debido a las características de los elementos que emanan, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.

**Comentarios:** Es una especie fácil de identificar macroscópicamente por la coloración ocre del manto muy característica y por los rizomorfos marrón oscuro.

- ***Russula drimeia* Cooke**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro con superficie granulada (Fig. 34). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura. No presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 2 y 6 mm y un diámetro del eje principal entre 0,46 y 0,63 mm. Las terminaciones no ramificadas son rectas, cilíndricas, con una longitud que oscila entre 0,25 y 2,60 mm y un diámetro entre 0,35 y 0,47 mm. En ocasiones, entre las partes jóvenes y las viejas aparecen constricciones. La superficie de las terminaciones no ramificadas es ocre, con superficie granulosa o escamosa. Las hifas que emanan y los rizomorfos son escasos.

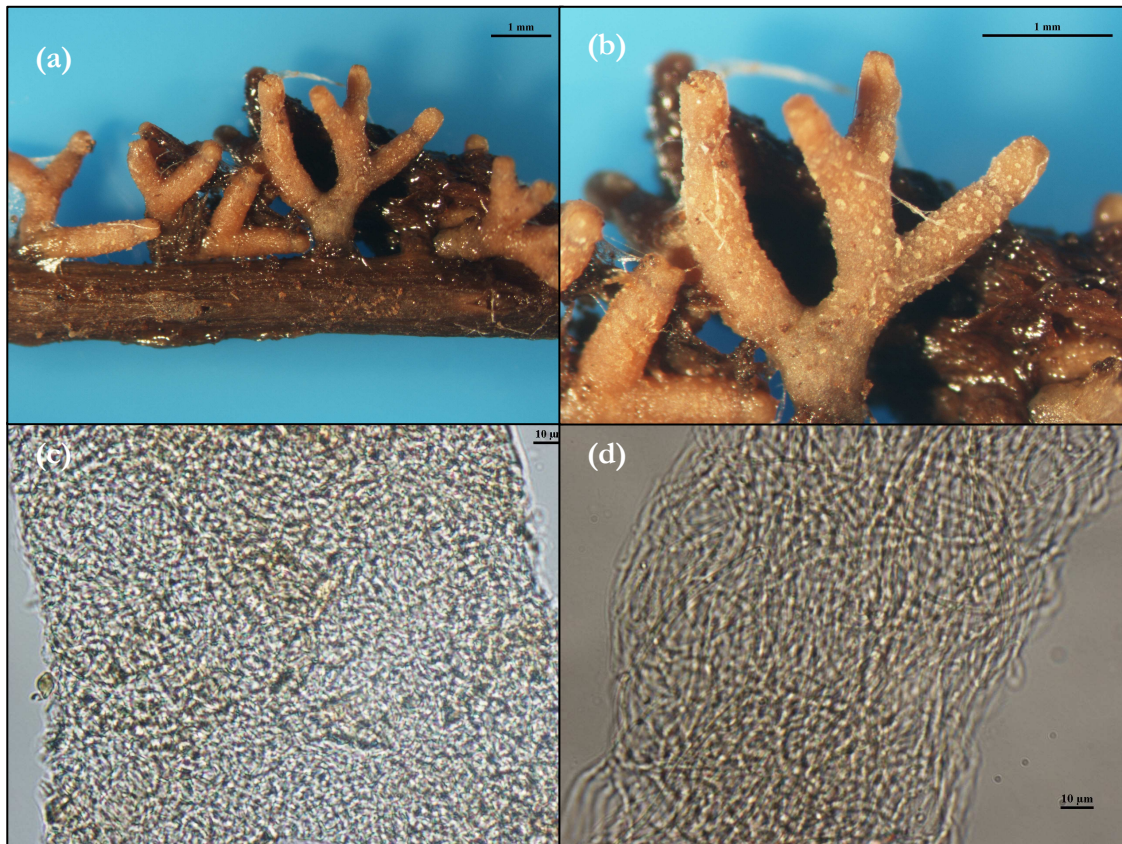
**Características anatómicas del manto:** manto externo pseudoparenquimático, con células en puzzle sobre las que se dispone una ligera red de hifas (Tipo Q).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas, hialinas, onduladas o tortuosas. Los rizomorfos son escasos, cilíndricos, de color marrón claro no diferenciados, formados por hifas uniformes ligeramente entretejidas (Tipo A). El diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,07 y 0,15 mm. Ausencia de cistidios. Debido a la escasez de elementos que emanan el tipo exploratorio es de corta distancia.

**Comentarios:** a pesar de la similitud en la coloración con *Tomentella sublilacina* o *Thelephora terrestris*, la presencia de escamas es un carácter identificativo de esta especie. También



podría confundirse macroscópicamente con *Russula ochroleuca*, aunque a nivel microscópico se diferencian por el tipo de manto, que en *R. ochroleuca* es tipo L.



**Figura 34.** *Russula drimeia*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Manto, barra 10 µm (c). Rizomorfo, barra 10 µm (d).

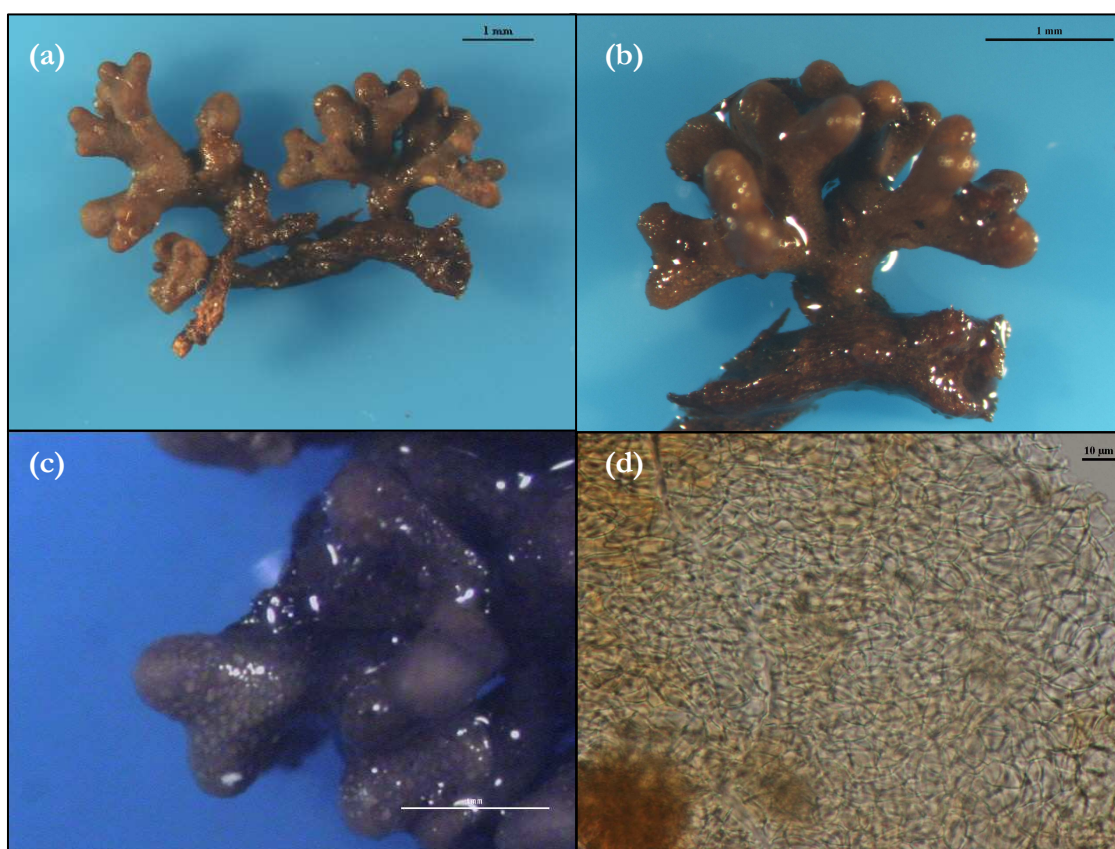
- ***Russula ochroleuca* (Pers.) Fr.**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro con la superficie granulada (Fig. 35). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma o coraloide, una longitud que oscila entre 2,0 y 3,7 mm y un diámetro del eje principal entre 0,35 y 0,65 mm. Las terminaciones no ramificadas son rectas y cilíndricas, tienen una longitud de 0,27 a 1,80 mm y un diámetro de 0,30 a 0,55 mm. Entre las partes jóvenes y viejas aparecen constricciones. La superficie de las terminaciones no ramificadas es de color marrón claro y presenta escamas en la superficie. Ausencia de hifas que emanan y de rizomorfos.

**Características anatómicas del manto:** manto externo pseudoparenquimático poligonal con células angulares (Tipo L).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** ausencia de hifas que emanan, de rizomorfos y de cistidios. Debido a la ausencia de estos elementos, el tipo exploratorio de esta especie es de corta distancia.

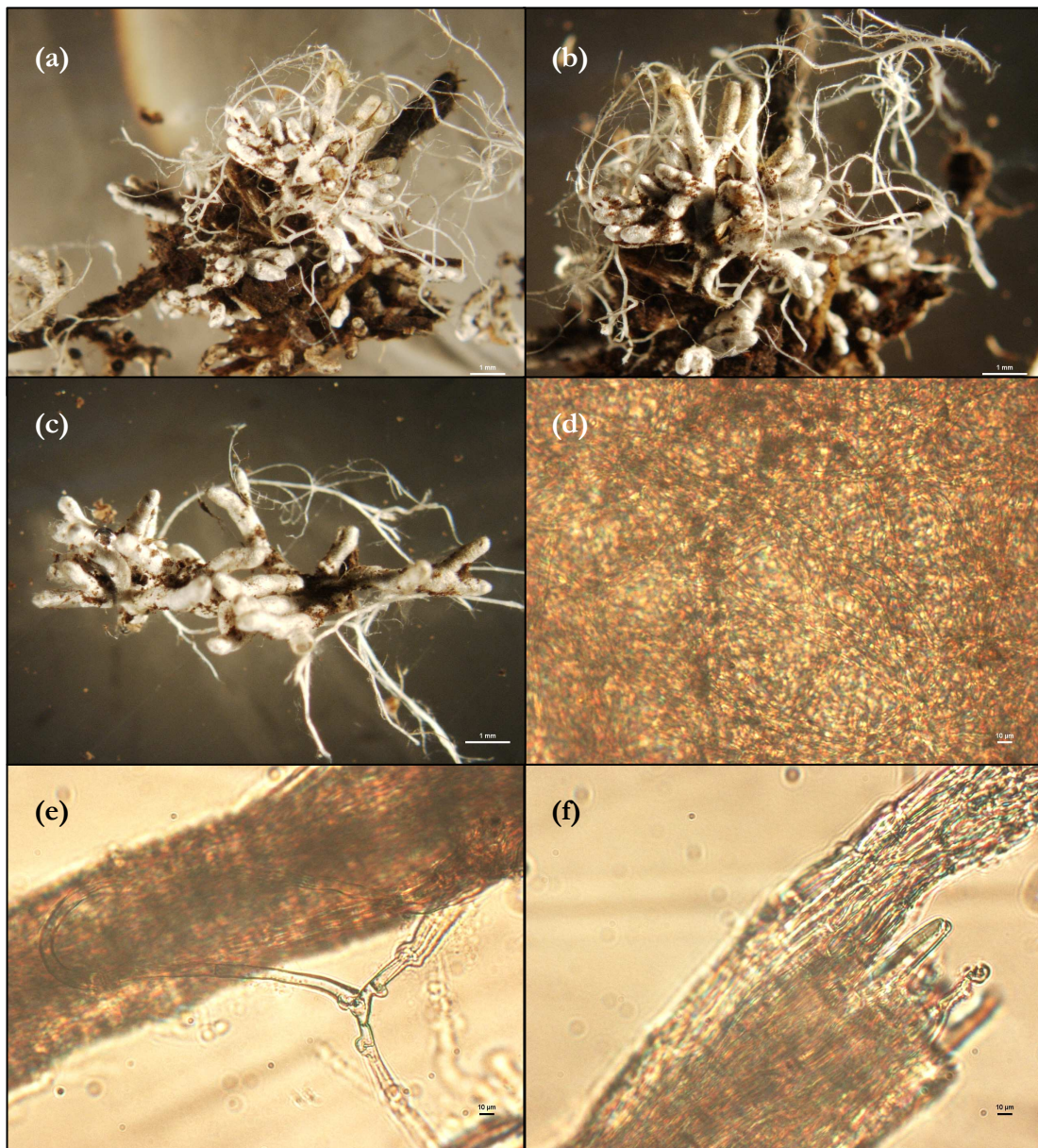
**Comentarios:** uno de los caracteres identificativos más importantes es la presencia de escamas en la superficie, aunque no siempre están presentes. Macroscópicamente se parece con *R. ochroleuca*, aunque ambas se diferencian a nivel microscópico por el tipo de manto, y con otras especies de coloración marrón, como *Tomentella sublilacina* o *Thelephora terrestris*.



**Figura 35.** *Russula ochroleuca*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Detalle de las escamas de la superficie, barra 1 mm (c). Manto, barra 10 µm (d).

- *Scleroderma citrinum* Pers.

**Características morfológicas:** micorriza de color blanco brillante con aspecto liso, fibroso y cilíndrico (Fig. 36). Las partes viejas presentan una coloración marrón oscura. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma o coraloide, una longitud que oscila entre 1 y 4 mm y un diámetro del eje principal entre 0,40 y 0,50 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud de 0,3 a 3,0 mm y un diámetro entre 0,35 y 0,45 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es de color blanco brillante, con los ápices cilíndricos, hinchados y lisos. Las hifas que emanan son escasas, mientras que los rizomorfos son abundantes.



**Figura 36.** *Scleroderma citrinum*. Micorriza, barra 1 mm (a-c). Manto, barra 10 µm (d). Rizomorfo, barra 10 µm (e,f).

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático de color amarillento, con hifas curvadas formando anillos (Tipo A).

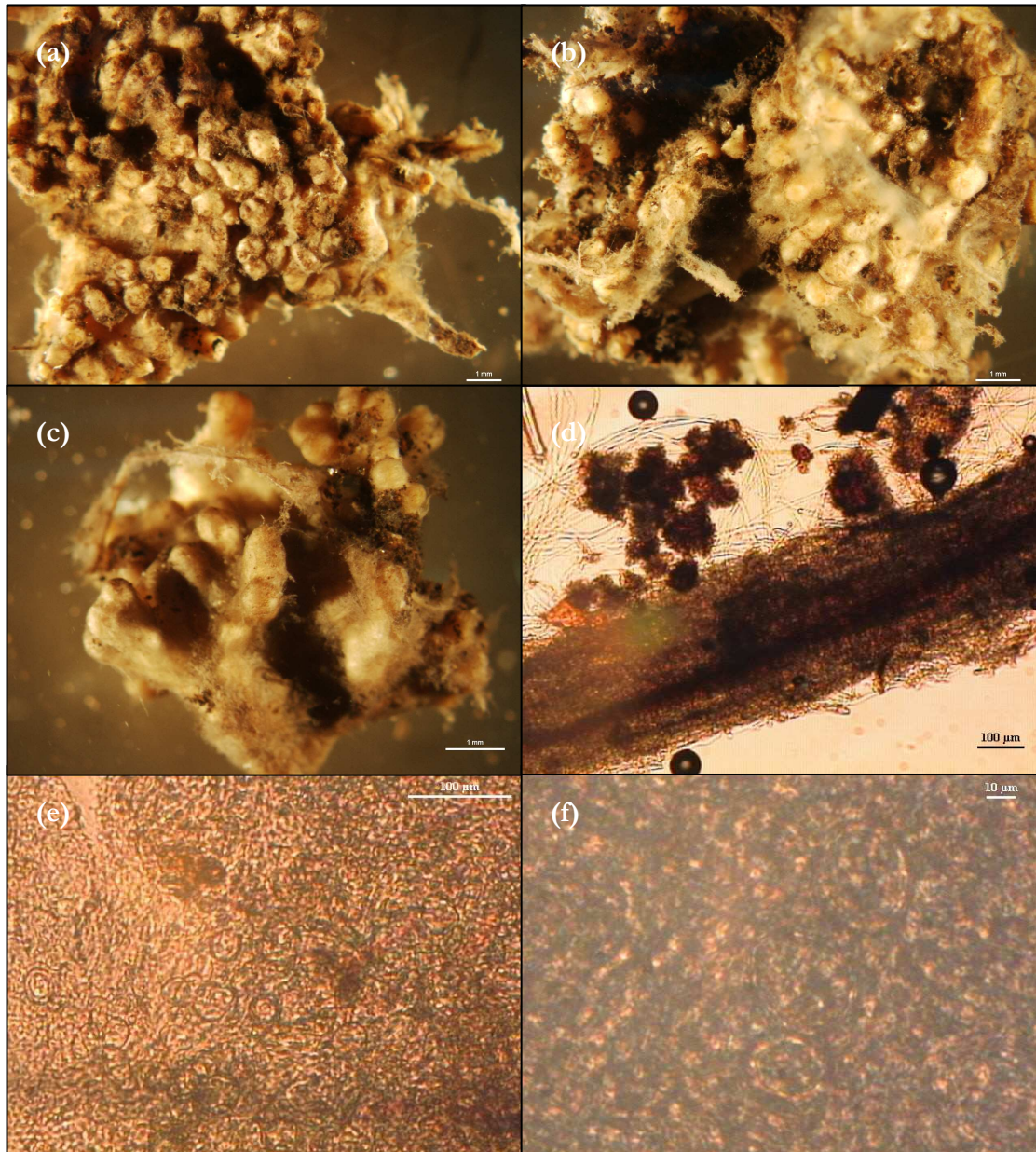
**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas y sinuosas sin una distribución específica. Se observan fíbulas. Abundantes rizomorfos cilíndricos, blanquecinos y altamente diferenciados (Tipo F). Los rizomorfos están muy ramificados y se unen en puntos restringidos. El diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,05 y 0,20 mm. Debido a la cantidad y al tipo de los elementos que emanan del manto, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.

**Comentarios:** la característica macroscópica más distintiva de esta micorriza es la superficie blanquecina brillante y la presencia de abundantes rizomorfos, sin embargo se puede confundir con otras micorrizas que presentan el mismo color tal como *Xerocomus badius* o *Paxillus involutus*. Se puede diferenciar fácilmente de *P. involutus* ya que este presenta un manto de tipo B y esclerocios. Diferenciar *S. citrinum* de *X. badius* es más complicado, ya que ambos presentan el mismo tipo de manto y abundantes rizomorfos. Puede ayudar el hecho de que *S. citrinum* presenta un fuerte olor fúngico en muestras frescas.

- ***Suillus bovinus* (L. ex Fr.) Kuntze**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro, con superficie blanca y gelatinosa, y abundantes partículas de suelo adheridas (Fig. 37). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación coraloide, una longitud que oscila entre 1,9 y 4,0 mm y un diámetro del eje principal entre 0,38 y 0,80 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,2 y 1,0 mm y un diámetro entre 0,25 y 0,50 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es de color marrón, con superficie gelatinosa blanquecina y ápices cilíndricos lisos. Las hifas que emanan del manto y los rizomorfos son escasos. Ausencia de cistidios.

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático de color amarillento, con células redondeadas sobre las hifas (Tipo F). Las células globulares tienen diámetro entre 0,01 y 0,03 mm.



**Figura 37.** *Suillus bovinus*. Micorriza, barra 1 mm (a-c). Rizomorfo, barra 100 µm (d). Manto, donde se observan las células redondeadas, barra 100 µm (e) y barra 10 µm (f).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** escasas hifas que emanan con ramificaciones, más abundantes sobre los rizomorfos que sobre el manto. Se observan fíbulas. Rizomorfos infrecuentes, cilíndricos, blanquecinos y diferenciados (Tipo F), aunque también se observan algunos indiferenciados. Los rizomorfos están conectados en puntos restringidos y presentan hifas con partículas de suelo adheridas. Su diámetro oscila entre 0,10 y 0,22 mm. Presencia de fíbulas. Ausencia de cistidios. Debido a la presencia de hifas que emanan y de rizomorfos altamente diferenciados, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.

**Comentarios:** Es una especie bastante fácil de identificar debido a dos características: la estructura coraloide compacta y la superficie gelatinosa.

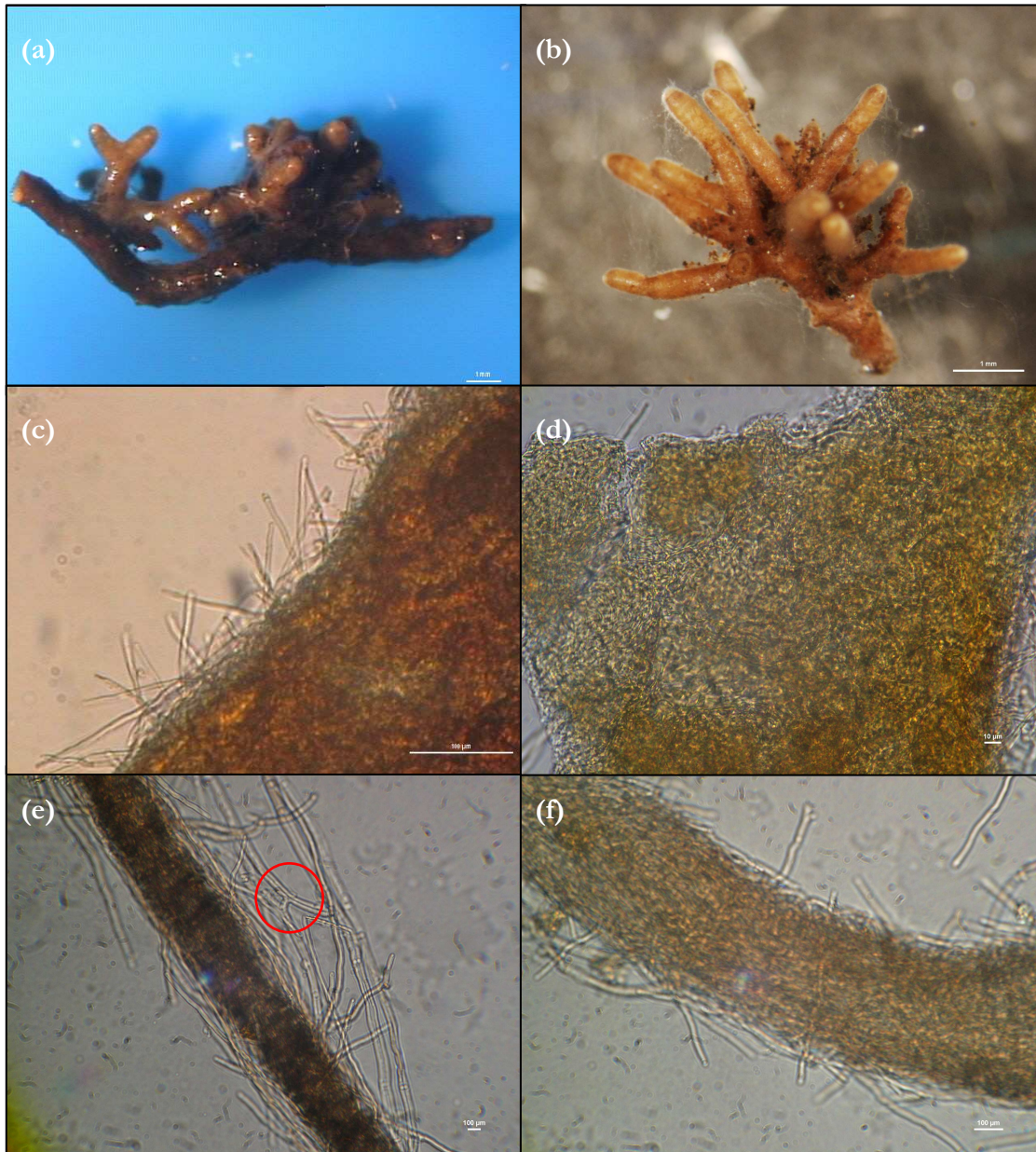
- ***Thelephora terrestris* Pers.**

**Características morfológicas:** micorriza de color marrón claro (ocre) con superficie algodonosa debido a la presencia de abundantes cistidios (Fig. 38). Forma glomérulos con partículas de suelo adheridas. Las partes viejas presentan coloración marrón oscura. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud que oscila entre 1,0 y 7,5 mm y un diámetro del eje principal entre 0,45 y 0,75 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,35 y 1,30 mm y un diámetro entre 0,30 y 0,55 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es ocre, con superficie algodonosa y con el ápice cilíndrico, no inflado y liso. Las hifas que emanan y los rizomorfos son escasos. Abundantes cistidios.

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático, con hifas dispuestas formando una red y cistidios prominentes en forma de aguja (Tipo D).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas, hialinas, lisas o tortuosas y con ramificación en Y. Se observan abundantes fíbulas. Los rizomorfos son escasos, cilíndricos, de color marrón claro y con ramificaciones. Los rizomorfos son no diferenciados, con hifas uniformes ligeramente entretejidas (Tipo A) y están conectados en puntos restringidos por la parte proximal de los ápices. El diámetro de los rizomorfos varía entre 0,03 y 0,11 mm. Presencia de abundantes cistidios hialinos en forma de aguja (Tipo A), cuya longitud oscila entre 0,01 y 0,10 mm. Debido a los elementos que emanan, el tipo exploratorio de esta especie es de media distancia subtipo liso.

**Comentarios:** Es muy fácil confundirla con otras micorrizas de coloración marrón. Su principal característica es la presencia de un manto de tipo D, con prominentes cistidios en forma de aguja.

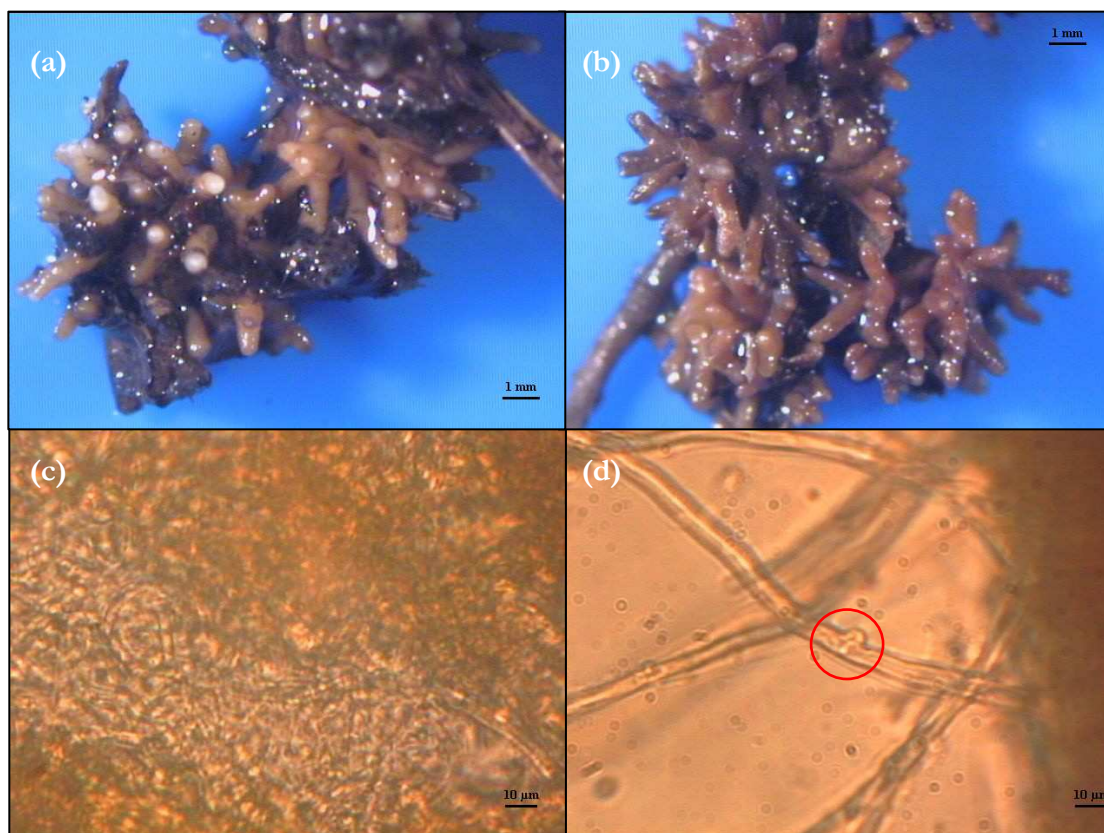


**Figura 38.** *Thelephora terrestris*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Cistidios en forma de aguja, barra 100  $\mu\text{m}$  (c). Manto, barra 10  $\mu\text{m}$  (d). Rizomorfo con anastomosis entre dos hifas, barra 100  $\mu\text{m}$  (e,f).

- ***Tomentella sublilacina* (Ellis & Holw.) Wakef.**

**Características morfológicas:** micorriza de coloración marrón con aspecto brillante. Las partes jóvenes presentan coloración ocre (Fig. 39). En ocasiones, presenta constricciones entre la parte joven y la vieja. Forma glómérulos con partículas de suelo. No presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud entre 1,0 y 4,5 mm y un diámetro del eje principal entre 0,3 y 0,7 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,5 y 2,0 mm y un diámetro entre 0,3 y 0,5 mm. La

superficie de las terminaciones no ramificadas es marrón brillante, aunque de color ocre en las estructuras jóvenes. Los ápices son cilíndricos, hinchados y lisos.



**Figura 39.** *Tomentella sublilicina*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Manto, barra 10  $\mu\text{m}$  (c). Fíbula, barra 10  $\mu\text{m}$  (d).

**Características anatómicas del manto:** manto pseudoparenquimático con células en puzzle sobre las que se dispone una ligera red de hifas (Tipo Q). En ocasiones se aprecia un manto en puzzle con células epidermoides (Tipo M).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas, lisas, hialinas y con fíbulas. Ausencia de rizomorfos y cistidios. Debido a la escasez de hifas que emanan y la ausencia de rizomorfos, el tipo exploratorio de esta especie es de contacto.

**Comentarios:** macroscópicamente esta micorriza se puede confundir con otras que presentan la superficie marrón, tal como los miembros del género *Russula* o *Lactarius*. Morfológicamente también se puede confundir con *Thelephora terrestris*, aunque a nivel

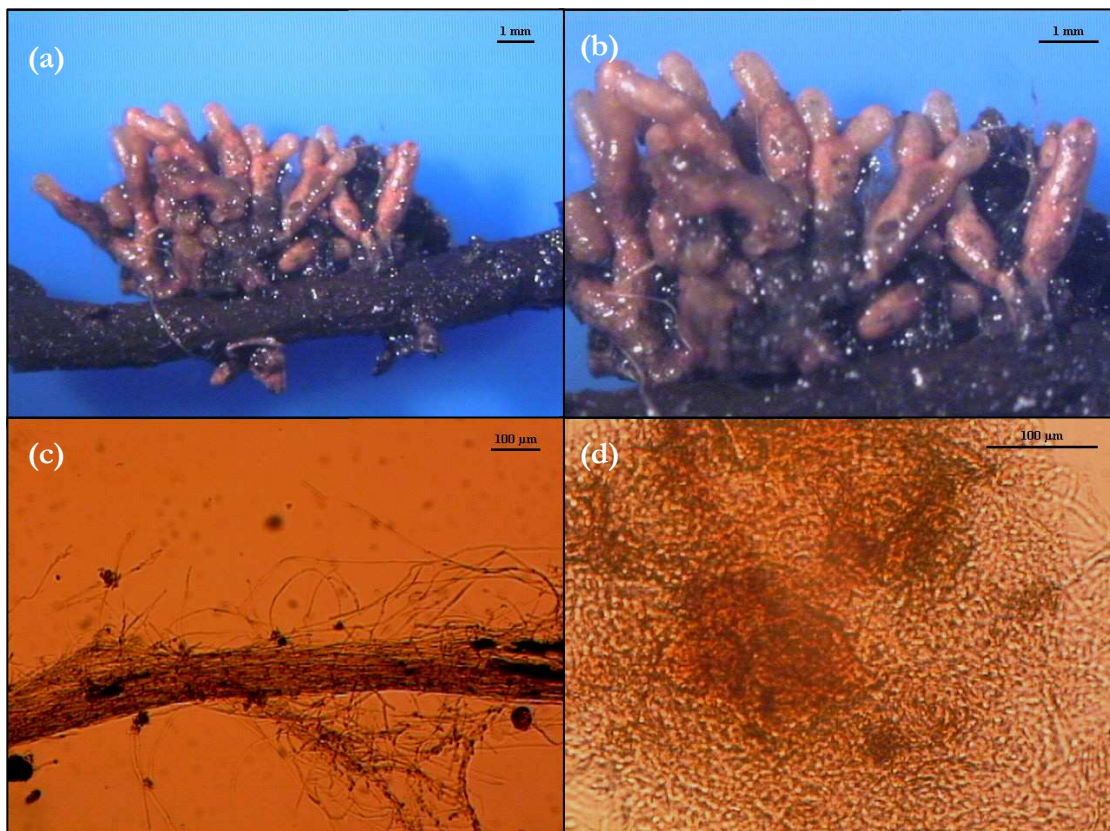


microscópico el manto en *T. sublilacina* es pseudoparenquimático, mientras que en *T. terrestris* es plectenquimático.

- ***Tomentellopsis submollis* (Svrcek) Hjortst.**

**Características morfológicas:** Las partes jóvenes presentan coloración rosada de aspecto brillante (Fig. 40). Sin embargo las partes viejas presentan coloración marrón, lo que podría llevar a confundirla con otras micorrizas. Forma glomérulos con partículas de suelo adheridas. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma, una longitud entre 1 y 6 mm y un diámetro del eje principal entre 0,4 y 0,6 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud que varía entre 0,5 y 2,2 mm y un diámetro entre 0,40 y 0,56 mm. Los ápices de las terminaciones no ramificadas son cilíndricos y lisos. Las hifas que emanan son escasas y los cistidios ausentes.

**Características anatómicas del manto:** manto plectenquimático de color amarillento con hifas curvadas formando anillos (Tipo A).



**Figura 40.** *Tomentellopsis submollis*. Micorriza, barra 1 mm (a,b). Rizomorfo, barra 100 μm (c). Manto, barra 100 μm (d).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas, lisas, hialinas y con fíbulas. Ausencia de cistidios. Los rizomorfos son no diferenciados (Tipo B), con hifas uniformes densamente entretrejidas, rosados, cilíndricos y conectados al manto en puntos restringidos. La superficie del rizomorfo presenta gran cantidad de hifas que emanan. Debido a la escasez de hifas que emanan y la presencia de rizomorfos poco diferenciados, el tipo exploratorio de esta especie es de media distancia subtipo liso.

**Comentarios:** el análisis molecular confirma que se trata del género *Tomentellopsis*, aunque el porcentaje de similitud obtenido (96%) no fue suficiente para determinar con seguridad la especie. Basándose en los caracteres morfológicos se podría afirmar que se trata de *Tomentellopsis submollis*, antes denominada como *Piniirrhiza rosea* (Agerer & Rambold 2004-2009). Hay que tener en cuenta que cuando la micorriza es joven su color rosado facilita la identificación, mientras que cuando es vieja y pierde esta coloración se puede confundir con otras micorrizas marrones, como por ejemplo *Tomentella* o *Thelephora*.

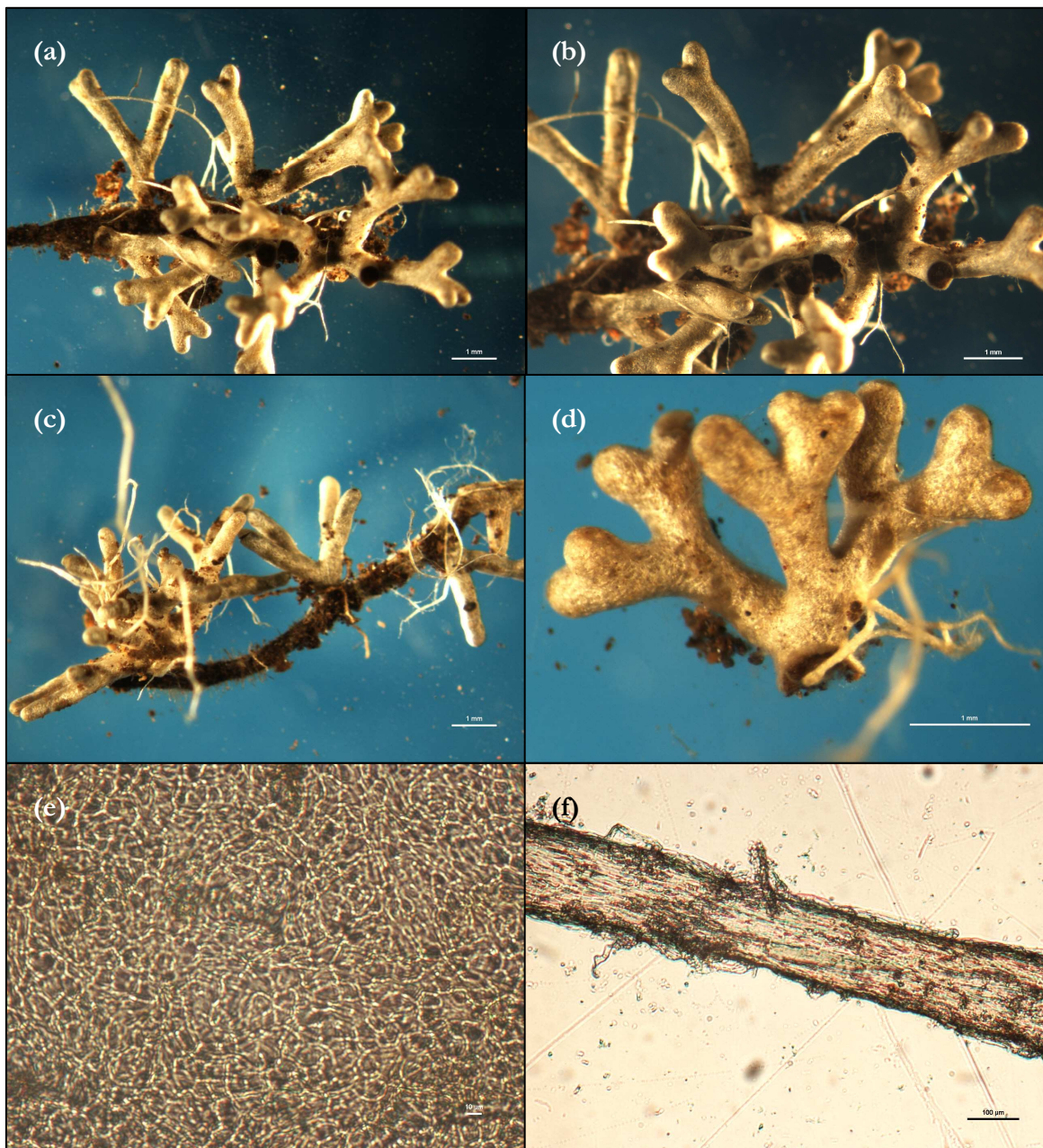
- ***Xerocomus badius* (Fr.) Kühner**

**Características morfológicas:** micorriza de color blanco brillante con aspecto liso y fibroso (Fig. 41). Las partes viejas presentan coloración marrón oscura. Presenta hidrofobia. Los sistemas micorrícicos presentan ramificación dicótoma o coraloide, una longitud entre 1,0 y 5,5 mm y un diámetro del eje principal entre 0,40 y 0,60 mm. Las terminaciones no ramificadas tienen una longitud entre 0,4 y 3,0 mm y un diámetro entre 0,35 y 0,50 mm. La superficie de las terminaciones no ramificadas es blanca, con el ápice cilíndrico, hinchado y liso. Las hifas que emanan son escasas. Presencia de rizomorfos

**Características anatómicas del manto:** manto externo plectenquimático de color amarillento, con hifas curvadas formando anillos (Tipo A).

**Características anatómicas de los elementos que emanan:** las hifas que emanan son escasas y sinuosas sin una distribución específica. Los rizomorfos son cilíndricos, blanquecinos y altamente diferenciados (Tipo F). Los rizomorfos crecen a partir del extremo de las terminaciones y pueden ser abundantes o estar del todo ausentes. El

diámetro de los rizomorfos oscila entre 0,04 y 0,10 mm. Debido a la cantidad y el tipo de elementos que emanan, el tipo exploratorio de esta especie es de larga distancia.



**Figura 41.** *Xerocomus badius*. Micorriza, barra 1 mm (a-d). Manto, barra 10  $\mu\text{m}$  (e). Rizomorfo, barra 100  $\mu\text{m}$  (f).

**Comentarios:** macroscópicamente la característica más significativa de esta micorriza es la superficie blanquecina brillante y la presencia de abundantes rizomorfos. La ausencia de esclerocios y el tipo de manto la diferencia de especies similares en coloración a simple vista, tal como *Paxillus involutus*. Diferenciar *X. badius* de *Scleroderma citrinum* es más complicado, ya que ambos presentan el mismo tipo de manto y abundantes rizomorfos.

Puede ayudar el hecho de que *S. citrinum* presenta un fuerte olor fúngico en muestras frescas.

### 2.4.3. Parámetros ecológicos de los ápices micorrizados

#### 2.4.3.1. Abundancia y frecuencia relativa. Valor de importancia

En la Figura 42 aparece representada la abundancia relativa de los géneros fúngicos identificados, repartidos según la localidad, el tratamiento y el año. Resulta evidente que la parcela A presentó un mayor número de géneros (16) que la parcela B (8). Durante el 2007, en la parcela A predominaron los géneros *Tomentella*, *Tomentellopsis* y *Thelephora*, todos ellos miembros de la familia Thelephoraceae, mientras que en la parcela B fueron encontrados principalmente *Rhizopogon* y *Thelephora*. En el 2008, en la parcela A predominaron los géneros *Suillus*, *Paxillus* y *Tomentellopsis*. En la parcela B fueron identificados sobre todo *Rhizopogon*, *Suillus* y *Thelephora*.

En el 2007, en comparación con el grupo control, en la parcela A se ha registrado una ligera tendencia a la reducción del número de géneros asociados a las plantas que recibieron la defoliación severa. De hecho, en el grupo control aparecieron 11 géneros, mientras que en los tratamientos de defoliación ligera y severa fueron detectados 10 y 8 géneros respectivamente (Fig. 43). El cálculo del valor de importancia para el grupo control y para el tratamiento de defoliación ligera ha evidenciado el predominio de *Tomentella*, *Thelephora* y *Tomentellopsis*. Sin embargo, en el tratamiento de defoliación severa el género *Russula* alcanzó el valor de importancia mayor a pesar de estar poco representado en el grupo control y en el del tratamiento de defoliación ligera. El género *Tomentella* fue dominante debido a su abundancia, independientemente del tratamiento (Fig. 43). Esto indica que tales hongos tienden a aparecer en sitios muy concretos, formando grandes agregados a nivel de las raíces, y con un gran número de ápices. Es importante destacar también la desaparición del género *Suillus* en el tratamiento de defoliación severa, a pesar de su abundancia en los otros tratamientos.

En el 2007, en la parcela B se han encontrado 2 géneros no detectados en la parcela A: *Inocybe* y *Rhizopogon*. También se ha registrado una reducción más pronunciada del número de géneros al aplicar una defoliación severa. En el grupo control aparecieron 7 géneros mientras que en los tratamientos de defoliación ligera y severa fueron encontrados 4 y 2 géneros respectivamente (Fig. 43). El cálculo del valor de importancia ha evidenciado el

predominio de *Thelephora* y *Rhizopogon*. En general, *Thelephora* resultó ser dominante debido principalmente a su abundancia. De hecho *Thelephora terrestris* tiende a aparecer en pocos sitios, formando grandes agregados y muchos ápices micorrizados. Sin embargo, *Rhizopogon*

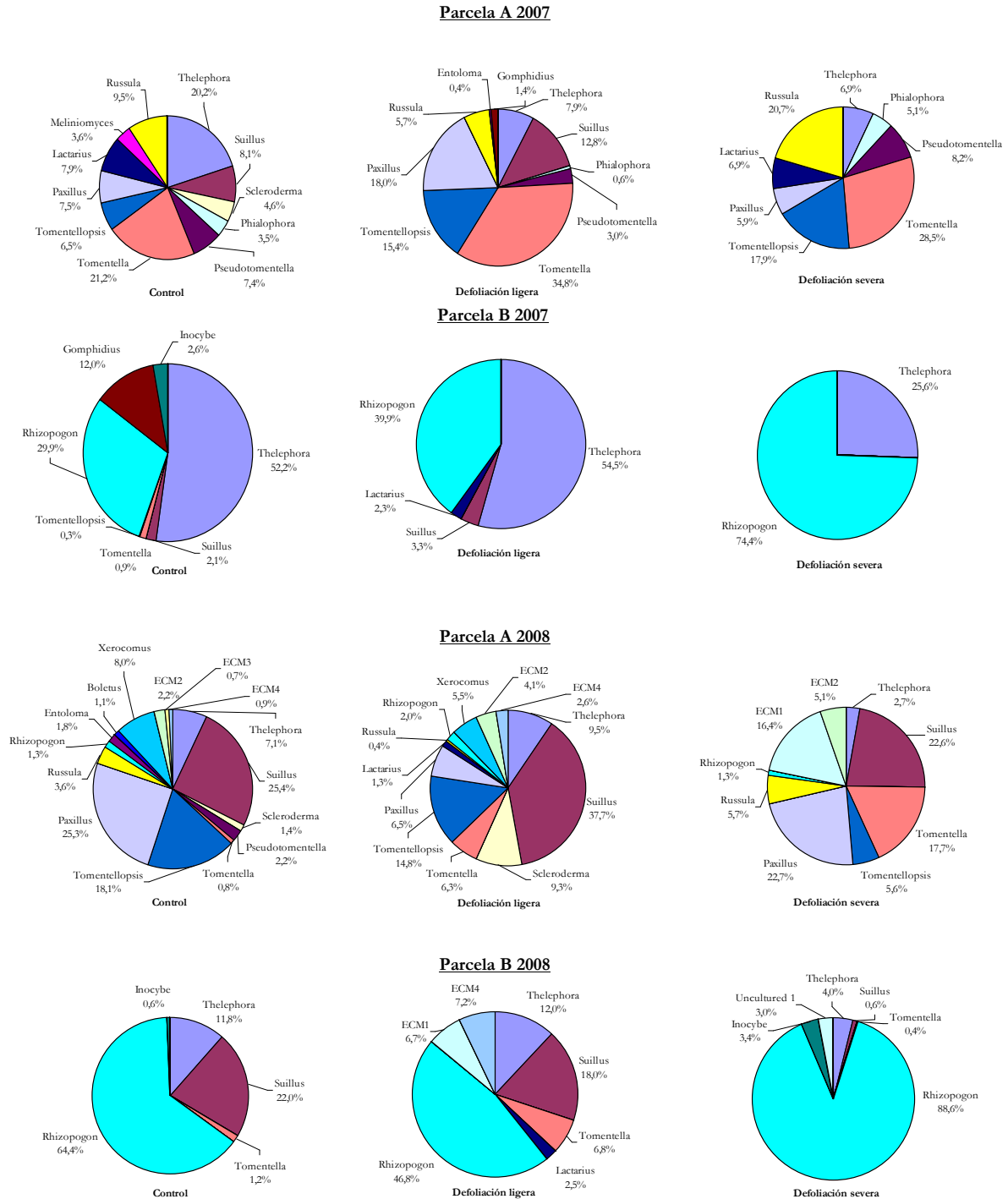


Figura 42. Abundancia relativa de los géneros encontrados a nivel de los ápices micorrizados, repartidos según tratamiento, parcela y año.

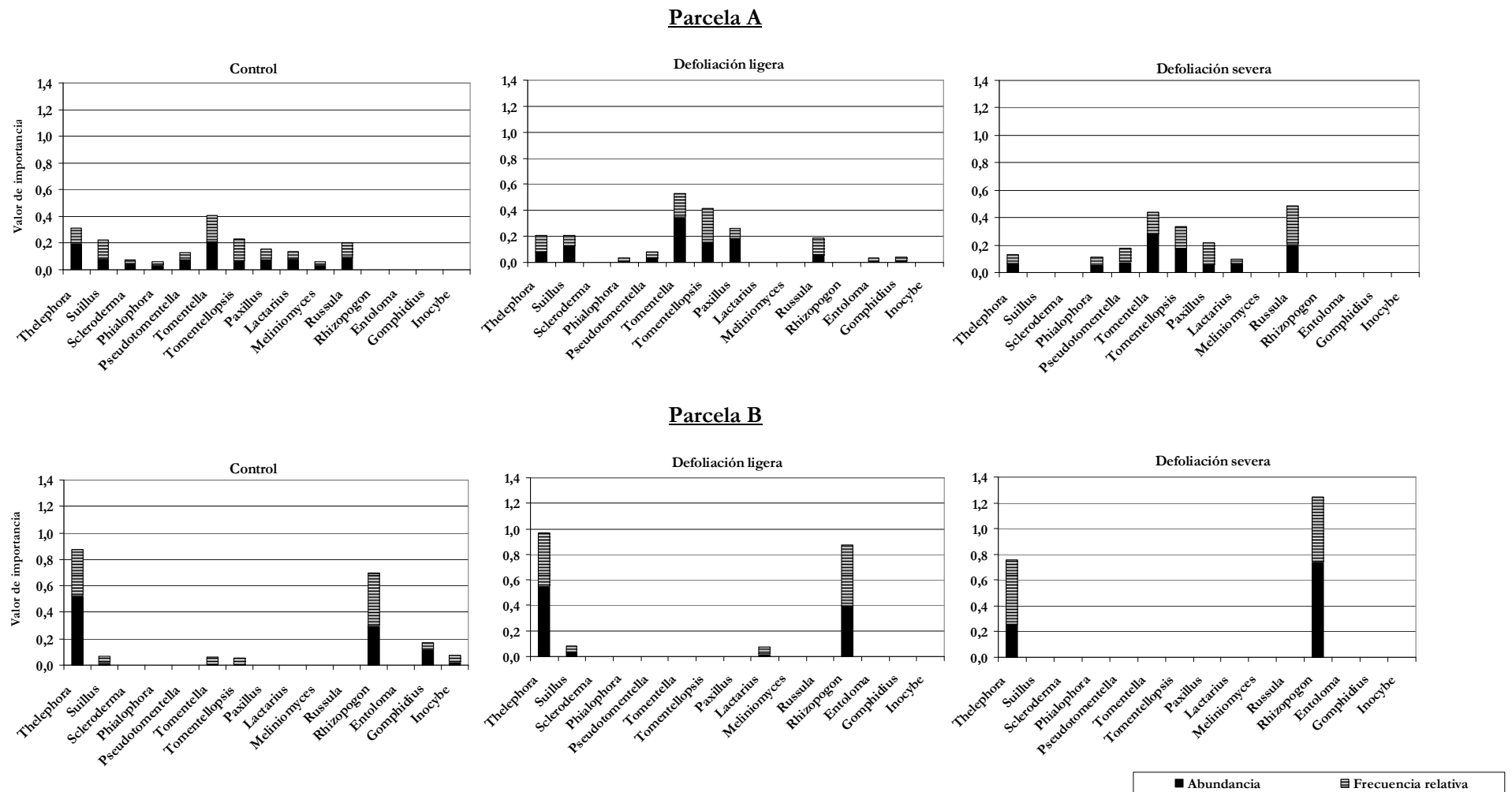
fue más importante por su frecuencia que por su abundancia, lo cual indica que se trata de un género ampliamente distribuido en el suelo, sin llegar a formar grandes agregados.

Durante el 2008, en la parcela A el número de géneros de ECM aumentó con respecto al 2007 (Fig. 42). De hecho en el grupo control había 15 géneros, en el tratamiento de defoliación ligera se encontraron 12 y en el tratamiento de defoliación severa fueron detectados 9. El valor de importancia indicó que los géneros predominantes no pertenecían a la familia Thelephoraceae como el año anterior, sino a los géneros *Suillus* y *Paxillus*. Estos hongos son dominantes en cuanto a su frecuencia (Fig. 44). Hay que destacar que la micorriza no identificada ECM1 (Ascomycota) sólo apareció de manera abundante en el tratamiento de defoliación ligera. Durante el 2008, también en la parcela B el número de géneros aumentó con respecto al año anterior, aunque en general se confirma como localidad más pobre desde el punto de vista micológico. El cálculo del valor de importancia evidenció el predominio del género *Rhizopogon* (Fig. 44).

#### 2.4.3.2. Porcentaje de micorrización, riqueza y diversidad

El porcentaje de micorrización, la riqueza y la diversidad de especies aumentaron en el 2008 en comparación con el año anterior, en el grupo control y en el de defoliación ligera (Fig. 45). El tratamiento de defoliación no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de micorrización en el 2007 ( $F_{2,84} = 0.19$ ,  $P = 0.824$ ), sin embargo en 2008 se detectó una reducción significativa ( $F_{2,84} = 3.53$ ,  $P = 0.034$ ), pasando de un 54% en las plantas del grupo control a un 42% en las plantas con defoliación severa (Fig. 45a). Los parámetros de crecimiento medidos en los árboles no tuvieron ningún efecto significativo sobre la colonización micorrícica en 2007 (datos no presentados), sin embargo en el 2008 la altura de la copa ( $F_{1,73} = 5.91$ ,  $P = 0.017$ ) y la longitud del brote terminal ( $F_{1,73} = 11.53$ ,  $P = 0.001$ ) tuvieron un efecto significativo y positivo sobre el porcentaje de micorrización.

La riqueza no fue afectada por la defoliación durante el 2007 (Wald statistic = 2.46, d.f. = 2,  $P = 0.298$ ), sin embargo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos durante el 2008 (Wald statistic = 14.24, d.f. = 2,  $P = 0.001$ ), en donde la riqueza disminuyó en el tratamiento de defoliación severa (Fig. 45b). La misma tendencia se observó para la diversidad (Fig. 45c) que no fue afectada por los tratamientos durante el 2007 (Wald statistic = 1.29, d.f. = 2,  $P = 0.528$ ), y se redujo significativamente en el 2008 (Wald statistic = 8.36, d.f. = 2,  $P = 0.015$ ).



**Figura 43.** Valor de importancia de los géneros encontrados en la parcela A y B durante el 2007.

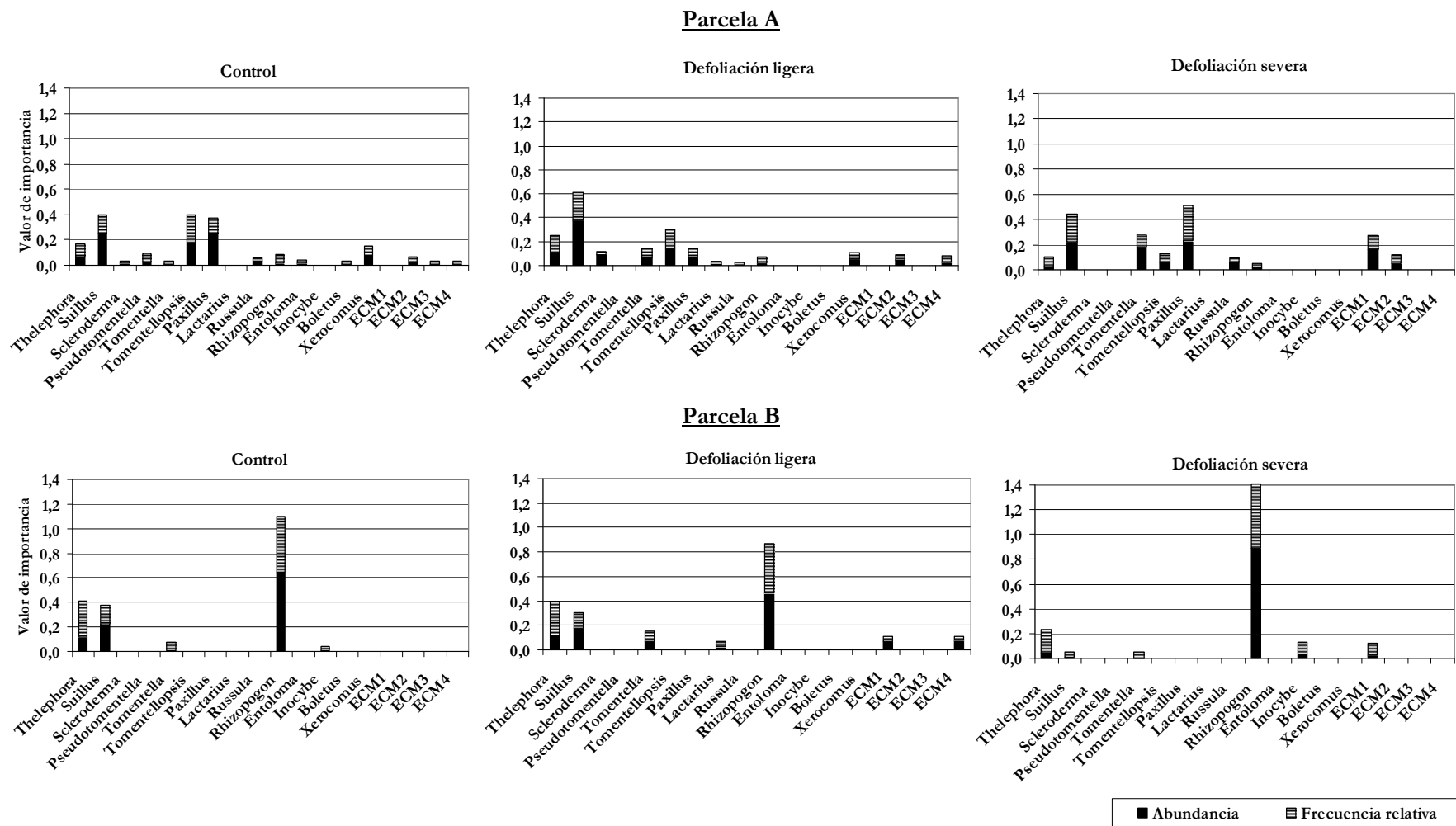
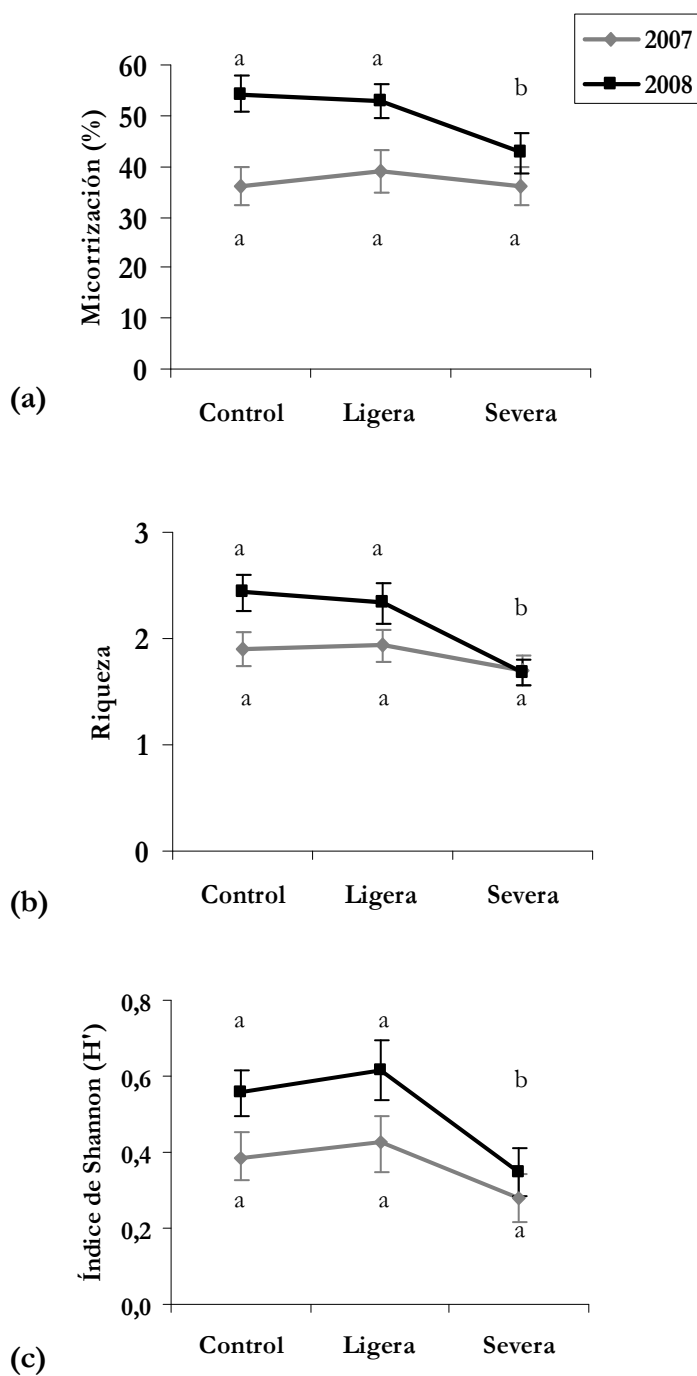


Figura 44. Valor de importancia de los géneros encontrados en la parcela A y B durante el 2008.

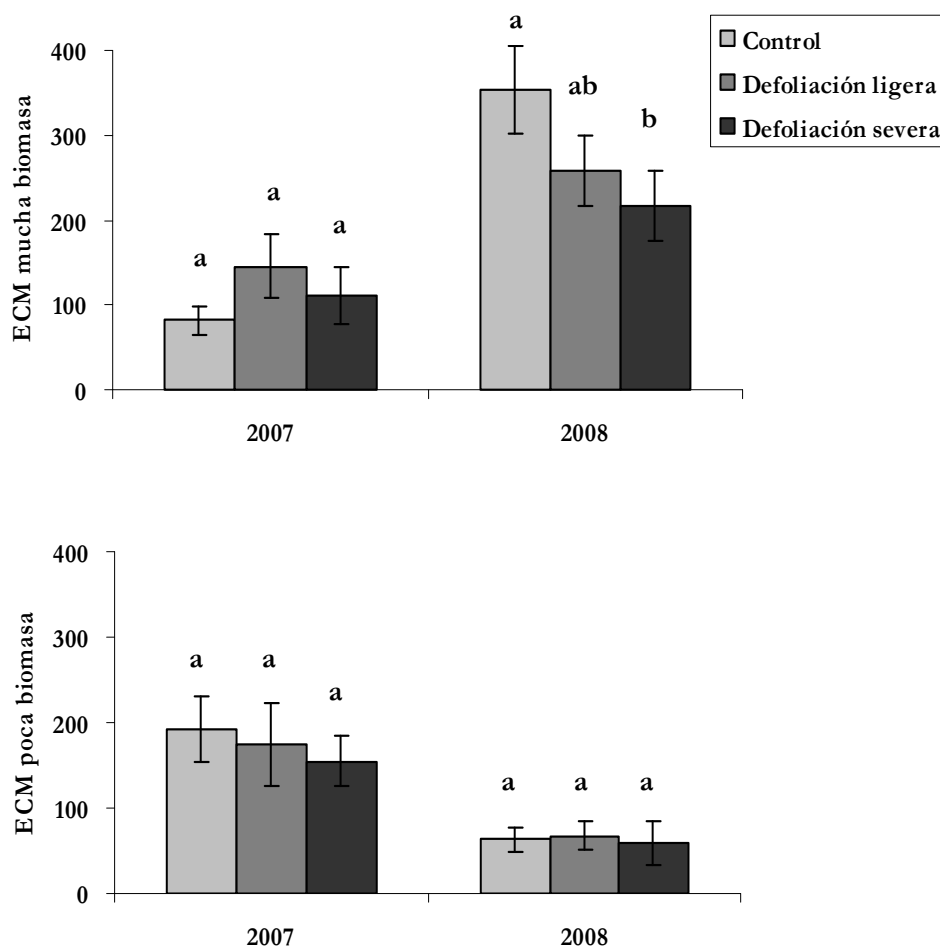




**Figura 45.** Porcentaje de micorrización, riqueza y diversidad durante 2007 y 2008 según los diferentes tratamientos de herbivoría. Las barras indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 2.4.3.3. Proporción de especies con poca y mucha biomasa

En el 2007 el tratamiento de defoliación no tuvo ningún efecto sobre la abundancia de las ECM que producen mucha biomasa (Fig. 46) ( $F_{2,82} = 1.11$ ,  $P = 0.335$ ). Los parámetros de crecimiento medidos en los árboles tampoco tuvieron un efecto sobre esta variable (datos no presentados). En el 2008, las ECM con mucha biomasa resultaron marginalmente afectadas por el tratamiento de defoliación ( $F_{2,82} = 2.58$ ,  $P = 0.082$ ). De hecho se observaron diferencias entre el grupo control y los árboles con defoliación severa en donde la abundancia de esta categoría de ECM disminuyó un 38%. Por otra parte, también el tamaño de copa del árbol tuvo un efecto significativo sobre esta variable ( $F_{2,68} = 7.72$ ,  $P = 0.007$ ). El tratamiento de defoliación no influyó sobre la abundancia de ECM con poca biomasa ni en 2007 ( $F_{2,59} = 0.09$ ,  $P = 0.910$ ) ni en 2008 ( $F_{2,59} = 0.33$ ,  $P = 0.718$ ). Tampoco los parámetros de crecimiento medidos en los árboles afectaron a esta variable (datos no presentados).



**Figura 46.** Valores medios del número de ápices de ECM que forman mucha biomasa y poca biomasa, repartidos según tratamiento y año. Las barras indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Analizando la relación entre los distintos taxones fúngicos encontrados y los tratamientos de defoliación aplicados, se detectó una disminución en la abundancia de dos géneros que forman mucha biomasa al aplicar el tratamiento de defoliación severa: *Suillus* durante el 2007 ( $r = -0.346$ ,  $P = 0.020$ ) (Fig. 43) y *Tomentellopsis* durante el 2008 ( $r = -0.352$ ,  $P = 0.018$ ) (Fig. 44). Sin embargo en el 2008, el género *Pseudotomentella* que forma poca biomasa desapareció en los árboles defoliados ( $r = -0.327$ ,  $P = 0.028$ ), aunque su abundancia fue en general siempre muy baja.

#### 2.4.4. Parámetros ecológicos de los carpóforos

##### 2.4.4.1. Identificación taxonómica

Durante los muestreos realizados desde 2007 a 2009 se recogieron 567 carpóforos de hongos ectomicorrícicos alrededor de los árboles del estudio (Tabla 14). Las especies de ECM pertenecían a 12 géneros y 16 especies: *Amanita gemmata*, *A. muscaria*, *A. rubescens*, *Amanita* sp., *Boletus* sp., *Cortinarius alboviolaceus*, *Hydnum repandum*, *Inocybe soluta*, *Laccaria amethystina*, *L. laccata*, *Paxillus involutus*, *Russula ochroleuca*, *R. sardonia*, *Russula* sp., *Scleroderma citrinum*, *S. verrucosum*, *Suillus bovinus*, *Thelephora terrestris* y *Xerocomus badius* (Fig. 47). Algunas especies no fueron identificadas taxonómicamente a nivel de especie porque estaban muy deterioradas, como por ejemplo *Boletus* sp. y *Russula* sp.. En otros casos, aún recurriendo al análisis molecular no se llegó a determinar la especie, como en el caso de *Amanita* sp., que presentó sólo un 96% de similitud con *A. sepiacea* (nº de acceso GenBank AY436473). Comparando estos resultados con la revisión bibliográfica de las especies fúngicas asociadas con *P. pinaster* que aparecen en artículos publicados entre 1922 y 2006 (Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009), se han encontrado 3 especies (*C. alboviolaceus*, *S. verrucosum* e *Inocybe soluta*) que nunca habían sido descritas en asociación con *P. pinaster*.

##### 2.4.4.2. Abundancia, frecuencia relativa y biomasa. Valor de importancia

Se recogieron 193 carpóforos en 2007 (192 en la parcela A y 1 en la parcela B) y 374 en 2008 (271 en la parcela A y 103 en la parcela B) (Tabla 13). El efecto de la defoliación sobre la diversidad y riqueza de especies que fructifican fue analizado en la parcela A durante 2007 y 2008. En la parcela B sólo se analizó durante el 2008, ya que en el 2007 sólo apareció 1 ejemplar de *Suillus bovinus*. Hay que destacar que el otoño de 2007 fue uno de los más secos en Galicia en los últimos 25 años. Esto provocó que las primeras fructificaciones fueran tardías y no aparecieran hasta finales de noviembre.

Durante el 2007 en la parcela A las especies dominantes fueron *Paxillus involutus* (45,6%) y *Suillus bovinus* (45,6%), mientras que en el 2008, fueron *Thelephora terrestris* (27,7%) y *Russula* sp. (18,8%). En la parcela B, la especie más abundante en el 2008 fue *Inocybe soluta* (56,3%). En la Figura 48 se representa el valor de importancia de las ECM encontradas como carpóforos en la parcela A durante el 2007. En el grupo control, los géneros dominantes fueron *Paxillus* y *Suillus*. Ambos géneros fueron dominantes debido a su abundancia. En el tratamiento de defoliación ligera, como en el caso anterior, los géneros dominantes fueron *Suillus* y *Paxillus*, aunque el género *Suillus* en este caso fue el más abundante y también el más frecuente. En el tratamiento de defoliación severa el cálculo del valor de importancia puso en evidencia que los géneros dominantes fueron de nuevo *Suillus* y *Paxillus*.



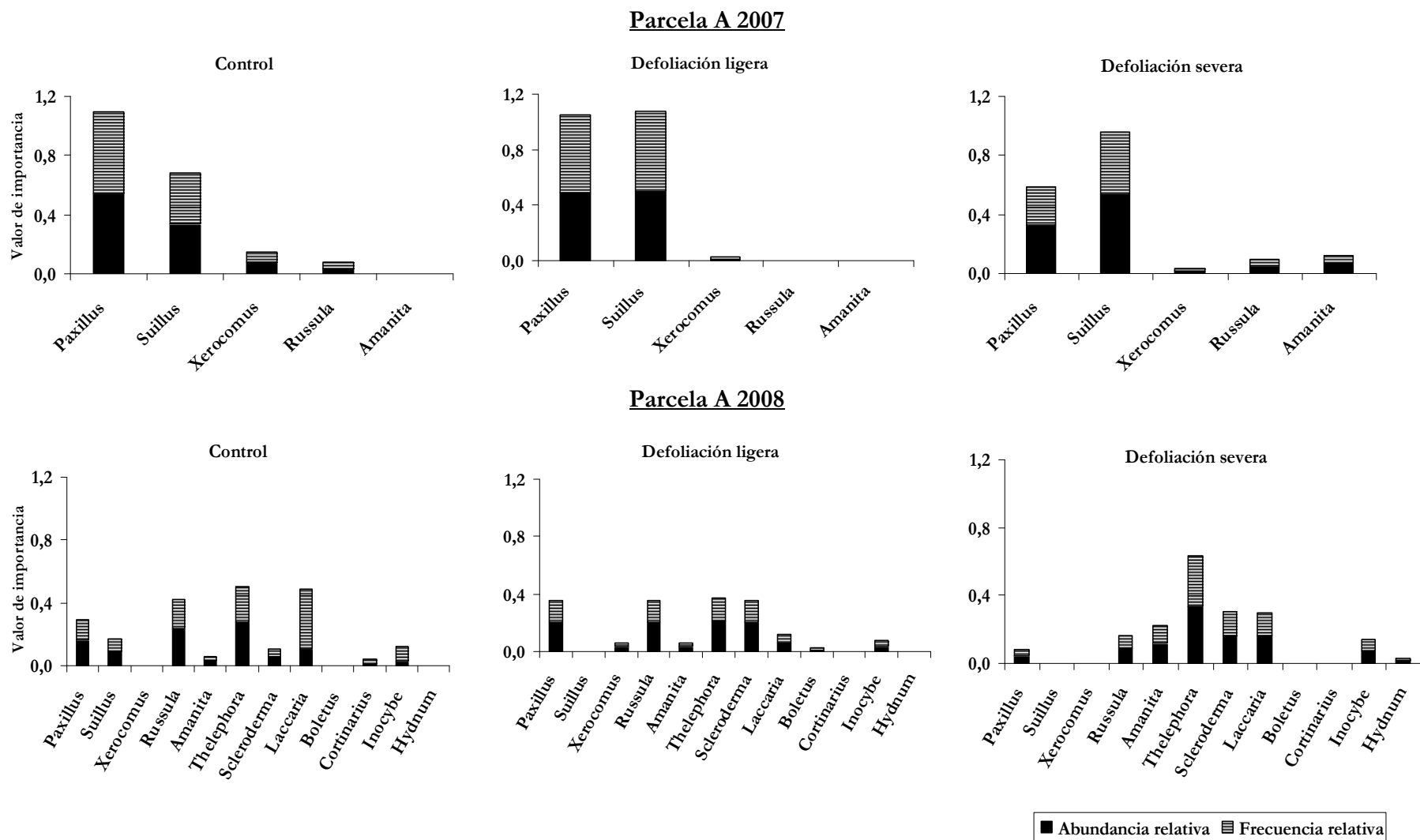
**Figura 47.** Carpóforos encontrados en las parcelas. *Thelephora terrestris* (a). *Inocybe soluta* (b). *Paxillus involutus* (c). *Suillus bovinus* (d).

En la Figura 48 se presenta el valor de importancia de los géneros de ECM encontrados como carpóforos en la parcela A durante el 2008. Se ha detectado una ligera reducción en el número de géneros, pasando de 9 en el control y el tratamiento de defoliación ligera a 8 en el tratamiento de defoliación severa. En el grupo control, el cálculo del valor de importancia muestra que los géneros dominantes fueron *Thelephora*, *Laccaria* y *Russula*. Tanto el género *Thelephora* como el género *Russula* fueron dominantes debido a su abundancia. Por el contrario, el género *Laccaria* destacó por su frecuencia. El grupo control fue el único tratamiento en donde se encontraron carpóforos del género *Cortinarius*. En el tratamiento de defoliación ligera, los géneros dominantes fueron *Thelephora*, *Russula*, *Scleroderma* y *Paxillus*, todos ellos dominantes debido a su abundancia. Además, fue el único tratamiento en el que aparecieron los géneros *Xerocomus* y *Boletus*. En el tratamiento de defoliación severa, se observó el predominio de *Thelephora* y fue el único tratamiento en el que apareció el género *Hydnum*.

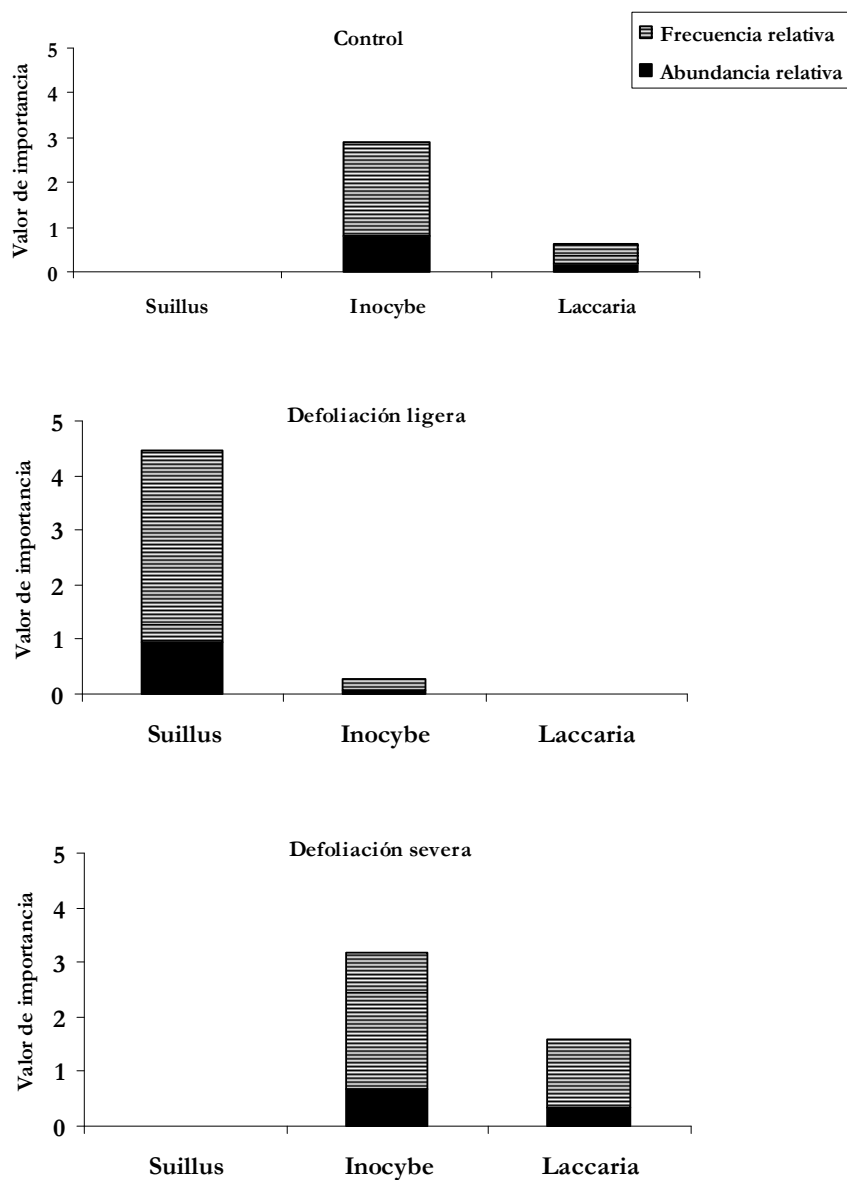
En la parcela B durante 2007 sólo apareció 1 carpóforo del género *Suillus*. Durante el 2008 aparecieron 103 carpóforos repartidos entre los géneros *Suillus*, *Inocybe* y *Laccaria* (Fig. 49). Estas setas se encontraron en 12 de los 45 árboles muestreados. En la mayoría de ellos sólo se encontraron carpóforos de la misma especie. En el control y en el tratamiento de defoliación severa el género dominante fue *Inocybe*, sin embargo en el tratamiento de defoliación ligera fue *Suillus*.

Tabla 14. Carpóforos recogidos en la parcela A y B durante 2007 y 2008 según los diferentes tratamientos de herbivoría.

	2007						2008						Total
	Parcela A			Parcela B			Parcela A			Parcela B			
	Control	Ligera	Severa	Control	Ligera	Severa	Control	Ligera	Severa	Control	Ligera	Severa	
<i>Amanita gemmata</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3
<i>Amanita muscaria</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Amanita rubescens</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	3
<i>Amanita sp.</i>	0	0	3	0	0	0	2	0	6	0	0	0	11
<i>Boletus sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Cortinarius alboviolaceus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Hydnum repandum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Inocybe soluta</i>	0	0	0	0	0	0	3	3	5	52	2	4	69
<i>Laccaria amethystina</i>	0	0	0	0	0	0	4	0	10	0	0	0	14
<i>Laccaria laccata</i>	0	0	0	0	0	0	8	5	1	11	0	2	27
<i>Paxillus involutus</i>	29	40	19	0	0	0	19	17	3	0	0	0	127
<i>Russula ochroleuca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>Russula sardonia</i>	0	0	0	0	0	0	28	17	4	0	0	0	49
<i>Russula sp.</i>	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Scleroderma citrinum</i>	0	0	0	0	0	0	7	16	11	0	0	0	34
<i>Scleroderma verrucosum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Suillus bovinus</i>	18	41	31	0	0	1	11	0	0	0	32	0	134
<i>Thelephora terrestris</i>	0	0	0	0	0	0	33	18	24	0	0	0	75
<i>Xerocomus badius</i>	4	1	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	9
Total	53	82	57	0	0	1	118	84	69	63	34	6	567



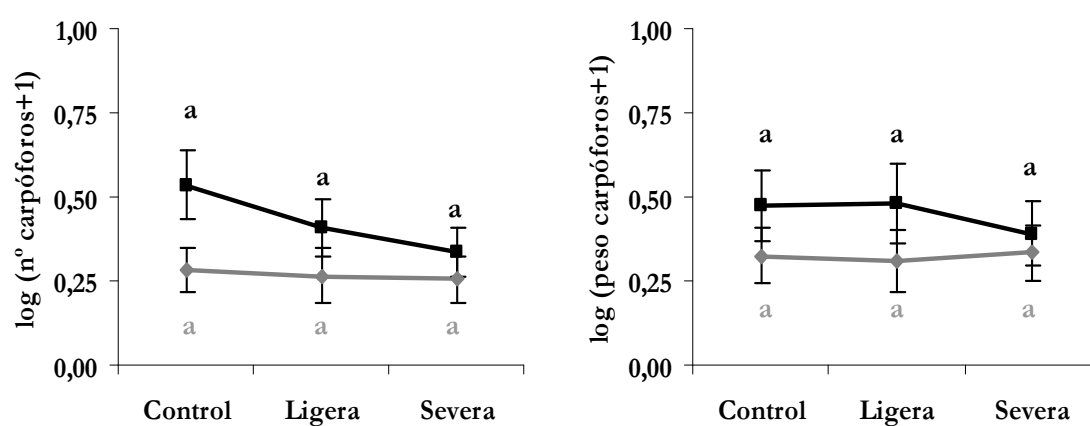
**Figura 48.** Valor de importancia de los géneros encontrados en forma de carpóforos en la parcela A durante el 2007 y 2008.



**Figura 49.** Valor de importancia de los géneros encontrados en forma de carpóforos en la parcela B durante el 2008.



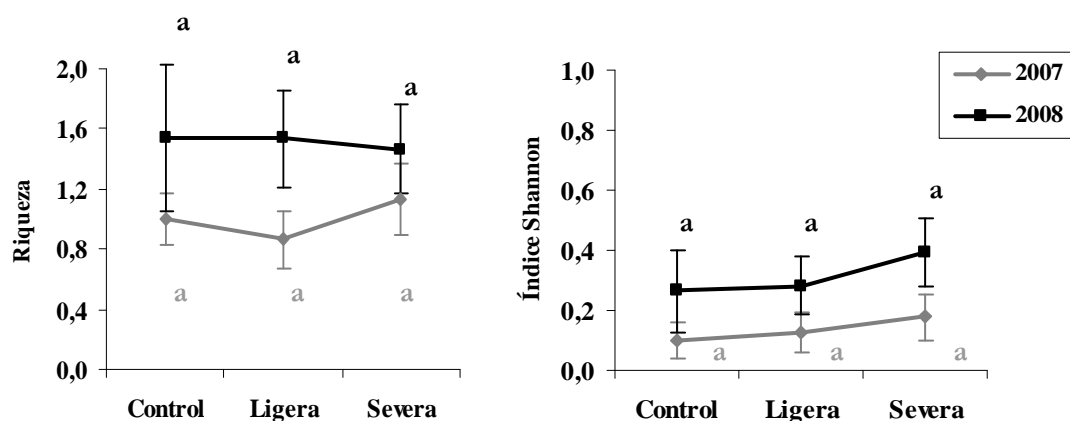
No se encontraron diferencias significativas en cuanto al número total de carpóforos entre los tratamientos de defoliación ni en 2007 ( $F_{2,89} = 0.08$ ,  $P = 0.923$ ) ni en 2008 ( $F_{2,89} = 1.58$ ,  $P = 0.213$ ) (Fig. 50). La misma tendencia se obtuvo al comparar la biomasa de los carpóforos entre los tratamientos en 2007 ( $F_{2,82} = 0.04$ ,  $P = 0.964$ ) y en 2008 ( $F_{2,82} = 0.32$ ,  $P = 0.726$ ). En ningún caso los parámetros de crecimiento medidos en los árboles influyeron sobre estas variables (datos no presentados).



**Figura 50.** Valores medios transformados ( $\log(x+1)$ ) del número total y de la biomasa de los carpóforos según el tratamiento en 2007 y 2008. Las barras indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4.4.3. Riqueza y diversidad

La frecuencia de carpóforos por árbol en la parcela B fue demasiado baja para analizar la riqueza y la diversidad de especies. La riqueza de especies en la parcela A (Fig. 51) no fue afectada por los tratamientos de defoliación ni en 2007 (GLM: deviance ratio = 0.33,  $P = 0.719$ ), ni en 2008 (GLM: deviance ratio = 0.01,  $P = 0.990$ ). La misma tendencia se ha encontrado para la diversidad de especies, ya que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni en el 2007 (GLM: deviance ratio = 0.40,  $P = 0.673$ ), ni en el 2008 (GLM: deviance ratio = 0.35,  $P = 0.707$ ).



**Figura 51.** Valores medios la riqueza y diversidad de carpóforos según el tratamiento en la parcela A en 2007 y 2008. Las barras indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 2.5. Discusión

En el presente estudio se ha utilizado el pino marítimo, al ser este una conífera perenne que suele transferir durante la primavera y el verano el nitrógeno, el fósforo y el potasio desde las hojas maduras a los brotes y hojas nuevas (Helmisaari 1992; Millard et al. 2001). Esto implica que una defoliación aplicada durante la primavera debería desencadenar un grave estrés nutricional para la planta. Mientras que en los árboles caducifolios la distribución de nitrógeno no se ve afectada por la pérdida de las hojas, en los árboles perennes la disminución de este nutriente después de una defoliación puede alcanzar el 50% (Millard et al. 2001) provocando graves consecuencias para la planta (Trumble et al. 1993; Ayres et al. 2004). Tal carencia podría incrementar la necesidad de la planta hospedadora de mantener la simbiosis con los hongos micorrícicos, ya que estos favorecen la adquisición de nutrientes (Kuikka et al. 2003). Sin embargo también se ha demostrado que los árboles defoliados pueden responder con una mayor capacidad fotosintética, compensando así la pérdida de nutrientes (Vanderklein & Reich 1999; Kolb et al. 1999). Por otra parte se ha comprobado que la defoliación provoca una reducción de la capacidad fotosintética en las plantas, lo que incrementa el coste, en términos de hidratos de carbono, de mantenimiento de los hongos simbiotes en las raíces (Wallace 1981; Gehring & Whitham 1991; Gehring & Whitham 2002). Por lo tanto se podría esperar una reducción de la inversión de la planta hospedadora en ECM, ya que es conocido que estas requieren entre un 10 y un 50% de la producción de fotosintetatos (Gehring & Whitham 2002; Hobbie & Hobbie 2006). En

realidad se ha comprobado que la pérdida de las hojas puede aumentar o disminuir la ventaja relativa de la simbiosis en función de la eficiencia del intercambio entre planta y hongo, es decir en función del balance entre el carbono adquirido y los nutrientes cedidos, y también en función de la importancia de los nutrientes obtenidos para la producción primaria de la planta (Tuomi et al. 2001).

Durante el 2007, los árboles defoliados en primavera sufrieron una pérdida importante de las reservas de nutrientes. De hecho, durante el 2008 en comparación con los árboles del grupo control, las plantas sometidas a una defoliación severa presentaron una reducción del número y de la longitud de los brotes, así como una reducción de la altura total y del diámetro del tronco. Por otra parte, los efectos producidos por el tratamiento de defoliación moderada oscilaron entre positivos y negativos, ya que por un lado aumentó el número de brotes y el número de piñas, lo cual sugiere la existencia de una respuesta compensatoria de la planta ante un estrés, y por el otro lado se redujo la altura del árbol, el diámetro del tronco y la longitud del brote terminal. Los resultados por lo tanto no concuerdan con otros estudios sobre la capacidad de *Pinus halepensis* para compensar los efectos negativos de la defoliación provocada por la procesionaria del pino, ya que en ese caso se registró un aumento de la altura de la planta y un incremento de la capacidad fotosintética (Pérez-Contreras 2008).

La reducción de la superficie foliar podría afectar a la reproducción de la planta, ya que existe un compromiso entre la inversión en crecimiento y la reproducción, de manera que la energía empleada en reproducción (producción de piñas) no puede ser empleada para el crecimiento. Es posible que para un pino que sufre una defoliación sea más rentable la inversión en crecimiento, ya que de esta forma consigue un aparato fotosintético más eficaz, que a su vez influirá en la producción de piñas en años sucesivos (Pérez-Contreras 2008). Sin embargo los resultados del presente estudio mostraron que los árboles defoliados no invirtieron más en crecimiento, y aún así en ningún caso la defoliación provocó una reducción en el número de piñas. Este resultado no concuerda con otros estudios en donde la defoliación ocasionada por la procesionaria del pino (Hódar et al. 2003) o por una defoliación artificial (Kuikka et al. 2003) inhibieron casi completamente la producción de piñas.

El porcentaje de colonización ectomicorrícica es una variable conservativa pero a la vez muy importante ya que describe el nivel de conexión que se establece entre la planta

hospedadora y los hongos para el transporte de nutrientes, y está estrechamente relacionada con el funcionamiento de la simbiosis (Simard et al. 2002; Saravesi et al. 2008). En este estudio se demuestra que una defoliación moderada (25%) durante dos años consecutivos no fue suficiente para comprometer seriamente el crecimiento de la planta hospedadora ni su inversión en ECM. Por otra parte, la defoliación severa (75%) redujo significativamente el crecimiento de los árboles y afectó a la colonización micorrícica en las raíces, aunque no a la producción de carpóforos. Está claro que el impacto que genera la defoliación sobre los simbiontes micorrícicos depende principalmente del porcentaje de hojas eliminadas durante la defoliación y de la duración del tratamiento. En este caso una defoliación severa aplicada durante 2 años consecutivos ha reducido del 23% la comunidad de ECM asociadas a las raíces. En estudios anteriores Del Vecchio et al. (1993) y Gehring & Whitham (1995) han documentado un efecto similar en *Pinus edulis*, ya que registraron una reducción del porcentaje de micorrización del 28% y 19% respectivamente, después de un año de defoliación. Esto sugiere que a corto plazo (1-2 años) los árboles sometidos a defoliación continúan invirtiendo en los hongos simbiontes. De hecho en los estudios donde se ha obtenido una reducción de la colonización micorrícica más pronunciada (33-44%) se aplicaron defoliaciones consecutivas durante 8-9 años.

Una teoría reciente propuesta por Talbot et al. (2008) denominada hipótesis “Plan B”, sugiere que los hongos micorrícicos son capaces de descomponer el carbono orgánico del suelo como alternativa a un bajo aporte de fotosintetatos por parte de la planta hospedadora. Este mecanismo quizás sea empleado por los hongos micorrícicos en respuesta a factores que reducen la actividad fotosintética, como por ejemplo la sombra, la herbivoría o la dormancia invernal. De hecho, se ha demostrado que las ECM presentan una mayor actividad enzimática extracelular durante los meses de invierno, cuando disminuye la actividad fotosintética (Buée et al. 2007; Mosca et al. 2007). La hipótesis predice que cuando la planta vuelve a aumentar la asignación de carbono hacia las raíces, la concentración de carbono en los hongos micorrícicos también aumenta y estos ya no tendrían la necesidad de metabolizar el carbono del suelo como fuente alternativa de energía (Talbot et al. 2008). Por el contrario, si la disponibilidad de recursos es alta, la planta evitaría la formación de micorrizas y estas se verían obligadas a extraer el carbono del suelo. De hecho, se ha demostrado que al añadir nitrógeno mineral en el suelo aumenta la descomposición de materia orgánica mediada por las micorrizas VA (Tu et al. 2006).

Los árboles utilizados para el experimento crecieron en suelos ricos en nutrientes, por lo que podrían tolerar una defoliación moderada sin consecuencias en el grado de micorrización de sus raíces. Este mismo argumento es defendido por otros autores, que demostraron como ciertos parámetros ambientales, como la humedad y el contenido de nutrientes del suelo, contribuyen a determinar si se produce una disminución de la colonización micorrícica como consecuencia de la herbivoría (Gehring & Whitham 1995; Saravesi et al. 2008).

Como ya se ha comentado anteriormente la defoliación de las acículas durante la estación de crecimiento afecta negativamente al desarrollo de las coníferas, ya que significa la pérdida de reservas en forma de carbono y nitrógeno (Saravesi et al. 2008). En el presente estudio la reducción de crecimiento de las plantas fue proporcional a la intensidad de la herbivoría (Tabla 11) y se reflejó de manera negativa en la colonización de las ECM en forma de ápices radicales. Es probable que la defoliación severa redujera en paralelo la biomasa de los árboles y el crecimiento de masa radical, como ya demostraron otros autores (Markkola et al. 1995; Saravesi et al. 2008).

Un efecto predecible de la herbivoría sobre la comunidad de ECM es un cambio en la composición de especies, que puede estar asociado a una reducción de la riqueza y de la diversidad (Del Vecchio et al. 1993; Gehring et al. 1997; Saikkonen et al. 1999). Debido a que la defoliación provoca una deficiencia de carbono, las especies con una baja demanda de este compuesto y que produzcan escasos y/o pequeños carpóforos podrían incrementarse (Cullings et al. 2001; Kuikka et al. 2003; Cullings et al. 2005; Saravesi 2008). Además se ha documentado que la planta hospedadora asigna preferiblemente más recursos a las especies fúngicas que le aportan mayores beneficios, demostrando que la relación simbiótica se mantiene sólo si los hongos micorrícicos proporcionan los beneficios suficientes para compensar el coste del mutualismo (Bever & Richardson, 2008). En el 2007, independientemente de la intensidad de la herbivoría, no se produjo ningún efecto significativo sobre la comunidad de ECM ni desde el punto de vista cuantitativo ni cualitativo. Sin embargo en el 2008, se produjo una reducción de la riqueza y de la diversidad de especies en los árboles sometidos a una defoliación severa. Varios estudios han documentado en árboles del género *Pinus* la existencia de una reducción de las especies micorrícicas con alta demanda de carbono después de una defoliación (Cullings et al. 2001; Saikkonen et al. 1999; Saravesi et al. 2008). Conforme a esta hipótesis se detectaron cambios en la abundancia de las especies fúngicas con alta demanda de carbono, que se

redujeron al aumentar el grado de defoliación, mientras que no se detectaron diferencias importantes en los hongos con baja demanda de carbono. Es interesante destacar que en el presente estudio el género *Suillus*, que pertenece al grupo con alta demanda de nutrientes desapareció como consecuencia de la defoliación severa en ambas parcelas en 2007. De hecho se ha demostrado que las plantas de *P. sylvestris* inoculadas con *S. bovinus* asignaban más carbono a las raíces que las plantas inoculadas con *Laccaria bicolor*, que forma micorrizas con poca biomasa (Gorissen & Kuypers 2000). Lo mismo ha ocurrido en el 2008 con *Tomentellopsis*, que disminuyó su abundancia en la parcela A como consecuencia del mismo tratamiento.

Con respecto a la producción de carpóforos, los resultados muestran que las ECM mantienen su reproducción sexual a pesar de la defoliación y de la limitación de nutrientes que sufre el hospedador. Aunque la producción de carpóforos constituye un importante sumidero de carbono para la planta hospedadora, la biomasa de las fructificaciones sólo representa una pequeña proporción de la biomasa total que forman las ECM. De hecho se ha demostrado que esta constituye solo un 2% de la biomasa total producida por las ECM en los bosques maduros de *P. sylvestris* y *Picea abies* (Markkola et al. 1995; Wallander et al. 2001). Esto podría explicar porque los efectos de la defoliación son más evidentes en los ápices micorrizados que en las fructificaciones. También se ha comprobado que al menos una parte de la biomasa de los carpóforos asociados a *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii* se sintetiza a partir de la metabolización del carbono del suelo por parte de las ECM, por lo que la reproducción de estos hongos no dependería exclusivamente del aporte de carbono de la planta hospedadora (Chapela et al. 2001; Hobbie et al. 2002).

Al estudiar una comunidad de micorrizas es importante integrar los datos relativos a las estructuras vegetativas (ápices radicales) y a las estructuras reproductoras (carpóforos), ya que ambas aportan información sobre la riqueza de especies. Durante el estudio los géneros *Amanita*, *Cortinarius*, *Hydnum* y *Laccaria* se encontraron en forma de carpóforos pero no se encontraron como ápices micorrizados. Por otra parte, sólo el 47% de los géneros descritos en forma vegetativa fueron encontrados también como setas. En concreto, los géneros *Entoloma*, *Gomphidius*, *Lactarius*, *Meliniomyces*, *Phialophora*, *Pseudotomentella*, *Rhizopogon*, *Tomentella* y *Tomentellopsis* no se encontraron en forma de carpóforo. Esto corrobora los resultados de otros estudios que indican como la abundancia relativa de algunas especies a nivel del suelo no se corresponde con su abundancia en forma de ápices micorrizados por debajo del suelo (Gardes & Bruns 1996; Horton & Bruns 2001; Pestaña Nieto &

Santolamazza Carbone 2009). Esto es debido a que algunas especies no forman estructuras reproductoras evidentes (resupinatos o costras) a pesar de ser abundantes en las raíces y viceversa, lo que implica la necesidad de utilizar muestreos de campo y el análisis molecular para obtener una visión completa de la comunidad de ECM.

Una caracterización morfológica y anatómica de las ECM previa al análisis molecular facilita sin duda la creación de grupos (morfortipos) y la sucesiva identificación de las diferentes especies presentes en una muestra de raíces (Wurzburger et al. 2001; Sakakibara et al. 2002). Sin embargo la identificación morfológica por sí sola es muy subjetiva ya que depende de un gran número de variables, como por ejemplo el estado de conservación de las muestras, la edad la micorrizas, las condiciones ambientales donde se desarrollan, la planta hospedadora, la habilidad y experiencia del investigador, así como el tiempo empleado en la caracterización (Wurzburger et al. 2001; Horton & Bruns 2001; Sakakibara et al. 2002; Pestaña Nieto & Santolamazza Carbone 2009). En este estudio se observó que casi todas las partes viejas de las micorrizas son marrones, lo cual llevaría a confundir unas especies con otras si sólo nos basáramos en su coloración. Sin embargo en otros casos la presencia de determinados caracteres como por ejemplo los esclerocios en *Paxillus involutus*, la ramificación coraloide de *Suillus bovinus* o el color rosado de *Tomentellopsis submollis* ha facilitado el proceso de identificación taxonómica.

Uno de los avances más importantes que ha permitido las técnicas moleculares ha sido la identificación de numerosas especies de Ascomycetes como simbiontes micorrícicos, formando ECM o micorrizas ericoides (Horton & Bruns 2001). En este estudio el phylum Ascomycota estaba representado por *Phialophora* sp., *Meliniomyces* sp. y dos especies de ECM no identificadas (ECM1 y ECM2). El hongo endófito septado oscuro (DSE) *Phialophora finlandia* ya había sido documentado en asociación con coníferas de bosques templados (Trevor et al. 2001; Tedersoo et al. 2003; Menkis et al. 2005). Sin embargo su papel como hongo simbionte es aún incierto, ya que estos hongos a menudo se asocian con herbáceas, arbustos y árboles en ecosistemas alpinos, boreales y templados (Caldwell et al. 2000). Por otra parte el hongo *Meliniomyces variabilis* fue descrito por primera vez por Hambleton (2005), que lo añadió al grupo “*Hymenoscyphus ericae aggregate*” que incluye a *H. ericae* (Leotiomycetes), *Cadophora finlandica* y algunos taxones todavía sin nombre. Sin embargo, como en el caso anterior, su estatus de hongo ectomicorrícico no está claro, aunque se ha demostrado que aparece asociada a plantas hospedadoras que forman ECM o micorrizas ericoides (Hambleton 2005).

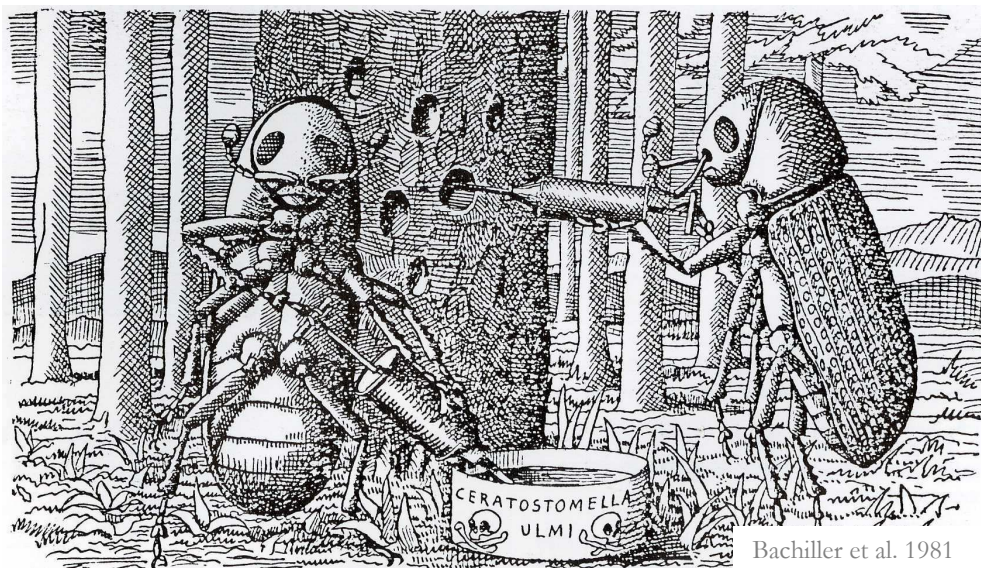
Para concluir, los resultados indican que el efecto de la herbivoría sobre la comunidad fúngica depende del porcentaje de herbivoría aplicado y del número de defoliaciones. Una defoliación ligera determinó una reducción del crecimiento de los árboles hospedadores, pero no provocó ningún efecto sobre el porcentaje de colonización fúngica o sobre la composición de la comunidad de hongos ectomicorrícicos asociados. Por otra parte, la defoliación severa afectó al crecimiento de los árboles y provocó una reducción significativa de la colonización de ECM en las raíces, de la diversidad y de la riqueza de especies. Los resultados confirman la fuerte relación que se establece entre las coníferas y las ECM, ya que cualquier situación de estrés sufrida por la planta hospedadora se refleja en la comunidad de hongos micorrícicos asociados a las raíces, y como consecuencia al ecosistema del subsuelo, ya que el micelio micorrícico es un vía importante para la incorporación de carbono en la materia orgánica del suelo (Ayres et al. 2004).





### 3. CAPÍTULO III: INTERACCIONES ECOLÓGICAS ENTRE INSECTOS XILÓFAGOS Y HONGOS PATÓGENOS

---



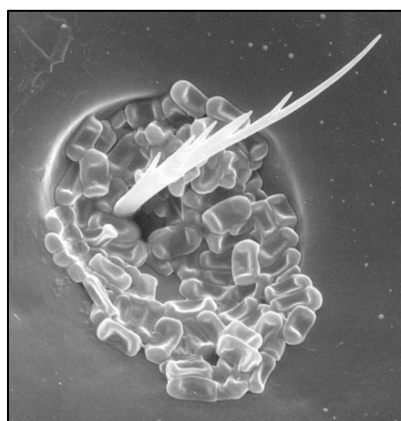
Bachiller et al. 1981



El estudio de las interacciones que se establecen entre plantas-hongos-insectos es un campo de interés creciente en la ecología aplicada, ya que ofrece una visión mucho más realista de la complejidad de las redes tróficas, en comparación con los estudios clásicos basados en la relación planta-hongo o planta-insecto (Hatcher 1995; Tscharncke & Hawkins 2002). Los estudios realizados sobre este tipo de interacciones han demostrado la enorme complejidad de las redes tróficas y la necesidad de realizar nuevas investigaciones que nos permitan entender su funcionamiento (Price et al. 1980; Barbosa et al. 1990; Gange & Brown 1997; Pace et al. 1999; Tscharncke & Hawkins 2002).

Por otra parte, debido al fuerte impacto económico y ecológico producido por las plagas agrícolas y forestales, resulta importante integrar el estudio de la respuesta de la planta hospedadora con la ecología de los organismos que producen patologías (Paine et al. 1997; Royama 1997; Dajoz 2000; Lieutier et al. 2004). Hartig (1878) fue el primero en descubrir en las coníferas las relaciones que existen entre los daños ocasionados por los insectos xilófagos y la presencia de hongos patógenos. Muchos insectos, y en particular las especies xilófagas, viven en asociación con organismos simbióticos que suelen ser hongos, pero también protozoos y bacterias, que se instalan en este caso en el tubo digestivo del hospedador (Dajoz 2000). Los sirícidos (Hymenoptera, Siricidae) pertenecientes a los géneros *Sirex*, *Tremex* y *Urocerus* conviven con hongos basidiomicetes del género *Amylostereum*, siendo la especie más frecuente *A. chailleti*. Cuando las hembras de *Sirex juvencus* hacen la puesta en la madera en ausencia del hongo, su éxito reproductor es prácticamente nulo, ya que el hongo es necesario para alimentar las larvas que son aún incapaces de excavar en la madera. La propagación del hongo en la madera se verifica a través de la hembra, que posee dos bolsas de esporas (micangios) situadas en la cavidad abdominal y que desembocan en la base del ovipositor. Las esporas son expulsadas con los huevos en la madera en el momento de la puesta. Cuando se produce la muda larvaria el tegumento de la pupa se contamina con las esporas del hongo lo que asegura su transmisión a la hembra adulta (Francke-Grosmann 1967). Otro ejemplo de este tipo de interacción se establece en los coleópteros de la familia Lymexylidae, concretamente en *Hylecoetus dermestoides*, en cuyas galerías se desarrolla el hongo *Ascoidea hylecoeti* (Ascomycota), que ataca a la madera suministrando elementos indispensables para el desarrollo larvario. También en este caso, la transmisión del hongo en las galerías está garantizada por la presencia de micangios situados cerca del extremo del ovipositor (Dajoz 2000).

Los escarabajos xilomicetófagos (Scolytidae) han desarrollado una verdadera asociación mutualista con los hongos patógenos del género *Ceratocystis*, cuya presencia es crucial también en el proceso de colonización del árbol por parte de los insectos (Jacobs & Wingfield 2001; Kirisits 2004). Estos insectos excavan sus galerías en la profundidad de la madera y mantienen sus paredes limpias y libres de deyecciones para que el hongo se desarrolle. La transmisión de las esporas fúngicas a la madera no es un simple proceso mecánico, ya que las esporas son incapaces de germinar sin un período previo de maduración y de proliferación en los micangios (Fig. 52). En este caso los micangios son representados por invaginaciones del tegumento en las cuáles se encuentran células glandulares especializadas, que producen secreciones necesarias para la alimentación de los hongos (Schneider & Rudinsky 1969; Dajoz 2000). Los escolítidos se benefician de la presencia de los hongos, ya que de estos depende la alimentación de las larvas, mientras que el hongo incrementa su capacidad de dispersión y de desarrollo en el interior de la planta a través de las galerías que realizan los insectos (Francke-Grosmann 1967; Norris 1979; Kirisits 2004). La relación de dependencia que se establece habitualmente entre ambos organismos es tan fuerte que las especies de hongos implicadas raramente se han localizado en zonas donde los insectos a los que se asocian no están presentes (Whitney 1982; Harrington 1993b; Wingfield et al. 1995; Paine et al. 1997; Lieutier et al. 2004).



**Figura 52.** Esporas fúngicas transportadas en el micangio de *Dendroctonus ponderosae*. (Imagen de Malcom M. Furniss, <http://www.pc.gc.ca/fra//docs/v-g/dpp-mpb/sec3/dpp-mpb3a.aspx>).

Existen principalmente cuatro hipótesis, que no se excluyen mutuamente, que podrían explicar la interacción entre los hongos patógenos y los insectos que colonizan la misma planta hospedadora:

- Los hongos son transportados a nuevas plantas hospedadoras por los insectos, que juegan el papel de agentes de dispersión (Paine et al. 1997).

- La asociación es simplemente casual y ocurre cuando la densidad de las poblaciones de insectos es muy alta (Viiri 2004).
- El hongo es utilizado como alimento por el insecto y juega un papel importante en el desarrollo de su progenie (Paine et al. 1997).
- El hongo patógeno debilita las defensas de la planta hospedadora, facilitando la sucesiva colonización por parte de los insectos (Jacobs & Wingfield 2001).

La literatura científica internacional proporciona muchos ejemplos que ilustran las relaciones mutualistas o antagonistas que se establecen entre los hongos del azulado de la madera y los insectos xilófagos: 1) las larvas de los coleópteros de la familia Anobiidae crecen más rápidamente cuando el micelio de un hongo es introducido en su dieta (Campbell & Bryant 1940); 2) el tamaño de los adultos de *Dendroctonus ponderosae* que emergen de *Pinus contorta* (Dougl. ex Loud.) infectado por los hongos *Ophiostoma montium* (Rumbold) y *Grosmannia clavigera* se incrementa (Bleiker & Six 2007); 3) la presencia de *Ophiostoma ips* en plantas de *Pinus resinosa* disminuye el ataque de *Ips pini* pero incrementa la producción de descendencia (Kopper et al. 2003); 4) la reproducción de *Hylastes salebrosus* e *H. tenuis* aumenta con la presencia de varias especies del género *Leptographium* (Eckhardt et al. 2004); 5) *Ophiostoma minus* ejerce un efecto antagonista en las larvas de *Dendroctonus frontalis* al reducir el contenido en nitrógeno en la dieta (Ayres et al. 2000; Kopper et al. 2003).

Es interesante el caso del escolítido *D. frontalis* que provoca importantes daños en coníferas y está relacionado con tres hongos simbióticos. Dos de ellos, *Ceratocystiopsis ranaculosus* y *Entomocorticium* sp., son mutualistas y son transportados en los micangios situados en el exoesqueleto del insecto (Barras & Perry 1972; Hsiau 1996). El tercer hongo, *Ophiostoma minus*, es un antagonista del insecto y es transportado externamente sobre el exoesqueleto. Se demostró que *C. ranaculosus* y *Entomocorticium* sp. actúan como patógenos en la planta hospedadora, proporcionan nutrientes para el desarrollo larvario del insecto y compiten con *O. minus* excluyéndolo de las áreas donde se desarrollan las larvas. Además se demostró que *Entomocorticium* sp. y *C. ranaculosus* diferían en la capacidad de competir con *O. minus*, siendo *Entomocorticium* sp. más beneficioso para el insecto (Klepzig & Wilkens 1997).

### 3.1. Influencia de la colonización de *Leptographium serpens* en plantas de *Pinus pinaster* sobre la biología del gorgojo del pino *Pissodes castaneus*

#### 3.1.1. Introducción

##### 3.1.1.1. Importancia de los hongos en la dieta de los insectos xilófagos

Los insectos xilófagos que se alimentan de floema están a menudo asociados con hongos del azulado de la madera (Ascomycota), en concreto con los géneros *Ophiostoma* y *Ceratocystis* y sus anamorfos (*Leptographium*, *Pesotum*, *Sporothrix* y *Hyalorhinocladiella*) (Raffa & Klepzig 1992), con hongos patógenos radiculares como *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (Paine et al. 1997) y *Armillaria* spp. (Fr.: Fr.) Staude, y, por último, con el hongo patógeno *Peridermium pini* (Pers.) Lev. (actualmente *Cronartium flaccidum* (Alb. & Schwein.) G. Winter), que produce la roya del pino provocando el anillamiento de ramas y tronco (Viiri 2004).

Las especies del género *Leptographium* (Ascomycota, Ophiostomataceae) son probablemente las más conocidas y las más estudiadas por su papel de agentes fitopatógenos forestales (Wingfield et al. 1988; Jacobs & Wingfield 2001; Eckhardt 2003; Eckhardt et al. 2004; Eckhardt et al. 2007). Este patógeno ha sido relacionado con el decaimiento y la mortalidad de los pinos, en asociación con escolítidos y curculiónidos que atacan principalmente las raíces de los árboles (Harrington & Cobb 1983; Nevill et al. 1995), aunque en Europa no está claro cual puede ser el vector de la enfermedad (Harrington 1993a). Un estudio reciente sobre *Pinus taeda* realizado en Alabama, ha demostrado que el 66% de *Hylobius pales* Herbst. y el 14% de *Pachylobius picivorus* Germar llevaban *L. procerum*, mientras que el 78% de *H. pales* y el 92% de *P. picivorus* transportaban *L. terebrantis* (Eckhardt et al. 2007).

La madera es un recurso que a menudo requiere un ataque preliminar de un hongo para poder ser consumido por los insectos xilófagos. Esto es debido a la presencia de sustancias tóxicas como alcaloides, terpenos y fenoles que hacen el sustrato incomedible para los insectos (Dajoz 2000). La calidad nutricional de la planta hospedadora se puede ver alterada por la infección de un hongo patógeno, debido a que este puede neutralizar los compuestos tóxicos con su arsenal enzimático (Hatcher 1995). Por ejemplo, se ha comprobado que el hongo *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd. (actualmente *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau) (Ascomycota: Ophiostomataceae) degrada diterpenos ácidos que presentan propiedades alelopáticas (Raffa & Klepzig 1992).

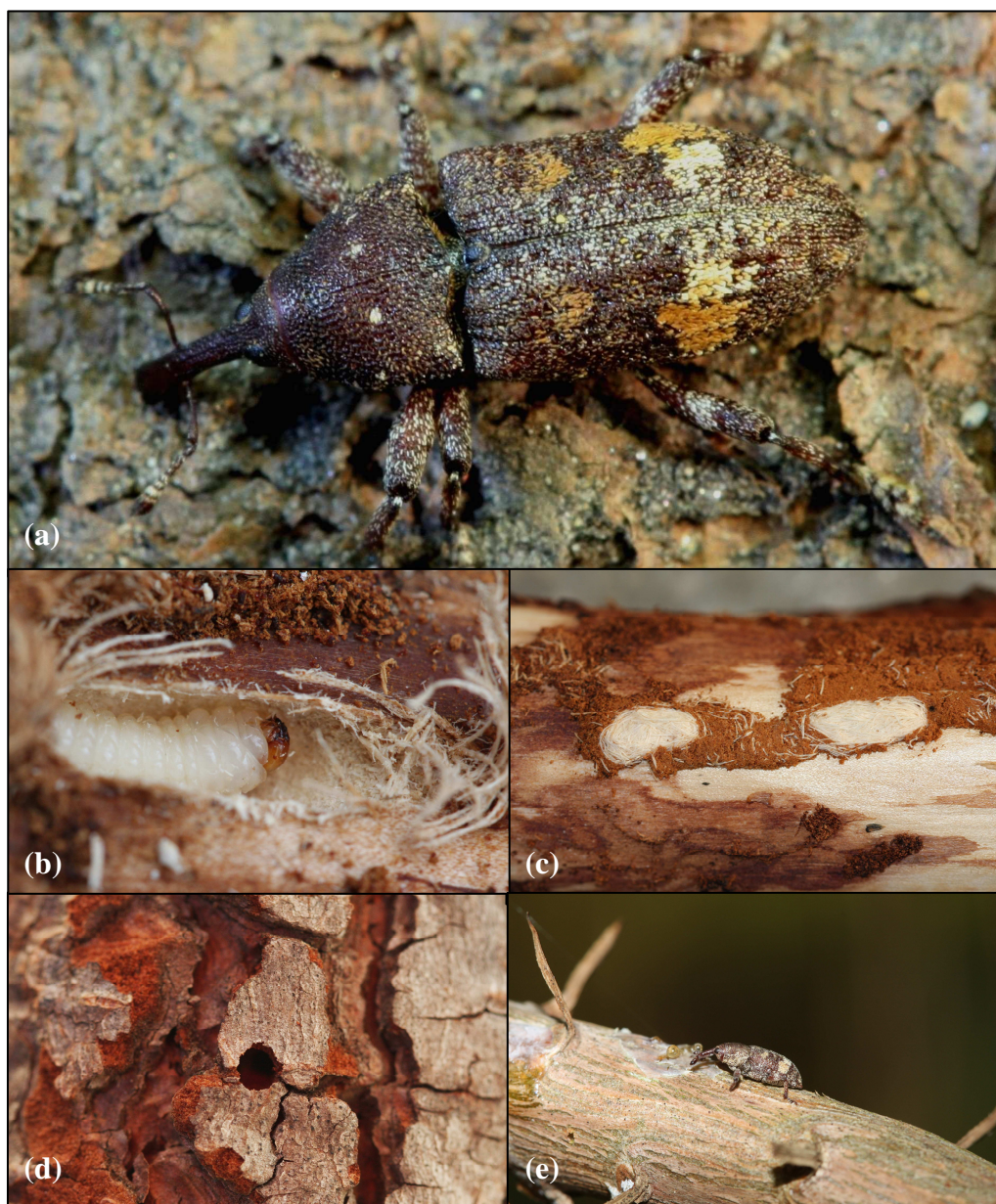
El contenido en nitrógeno y fósforo de la madera es muy bajo para la alimentación de los insectos xilófagos, y esto puede limitar su crecimiento y reproducción (Mattson 1980). El contenido en nitrógeno en el floema de *Pinus taeda* alcanza el 0,38% aproximadamente (Hodges et al. 1968), mientras que en las acículas se llega al 1-5% (Mattson 1980). Considerando que los insectos xilófagos contienen entre un 6 y un 10% de nitrógeno, durante su fase de desarrollo deberían concentrar este nutriente entre 16 y 26 veces (Ayres et al. 2000). Por consiguiente, los insectos han desarrollado diferentes estrategias para satisfacer sus necesidades nutricionales como por ejemplo: 1) incrementar la eficiencia en el uso de estos nutrientes, 2) incrementar la ingesta, 3) aumentar la duración de la fase larvaria, 4) ajustar su ciclo de vida a las estaciones en donde se incrementa el contenido de nitrógeno y fósforo, 5) alimentarse de tejidos específicos con alto contenido en nutrientes y 6) manipular la dieta para incrementar el contenido en nitrógeno y fósforo, transportando por ejemplo hongos que puedan concentrar estos nutrientes en el floema (Ayres et al. 2000).

Los hongos de la madera hacen que esta sea más blanda y rica en nutrientes y esteroides necesarios para la dieta de los insectos xilófagos (Dajoz 2000). Los esteroides son componentes esenciales para la formación de las células, precursores de la síntesis hormonal e indispensables para la formación de huevos, pero su contenido en el floema es generalmente muy bajo (Klepzig & Six 2004). De hecho, en *Pinus taeda* L. se ha demostrado un incremento en el contenido de nitrógeno del floema de un 131% después de la introducción de *D. frontalis* y de un hongo asociado a este (Hodges et al. 1968). Además, se ha estimado que un insecto necesita consumir 36,2 g de madera para obtener una cantidad de nitrógeno igual que la que se encuentra en 3,7 g de micelio o en 1 g de esporas del hongo *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Basidiomycota: Ganodermataceae) (Dajoz 2000).

#### 3.1.1.2. Biología y ecología de *Pissodes castaneus* De Geer.

El adulto de *Pissodes castaneus* De Geer presenta una longitud entre 6 y 9 mm y una coloración pardo rojiza (Fig. 53). Durante el experimento que se expondrá a continuación se ha estimado el tamaño corporal de 1966 adultos (970 machos y 996 hembras) midiendo el ancho y el largo de los élitros con un calibre digital. Los resultados muestran que las hembras son más largas que los machos (ANOVA:  $F_{1,1964} = 15.82$ ,  $P < 0.001$ ), aunque no se observó la misma tendencia para el ancho, en donde no se detectaron diferencias significativas entre sexos ( $F_{1,1964} = 1.22$ ,  $P = 0.270$ ) (Fig. 54).

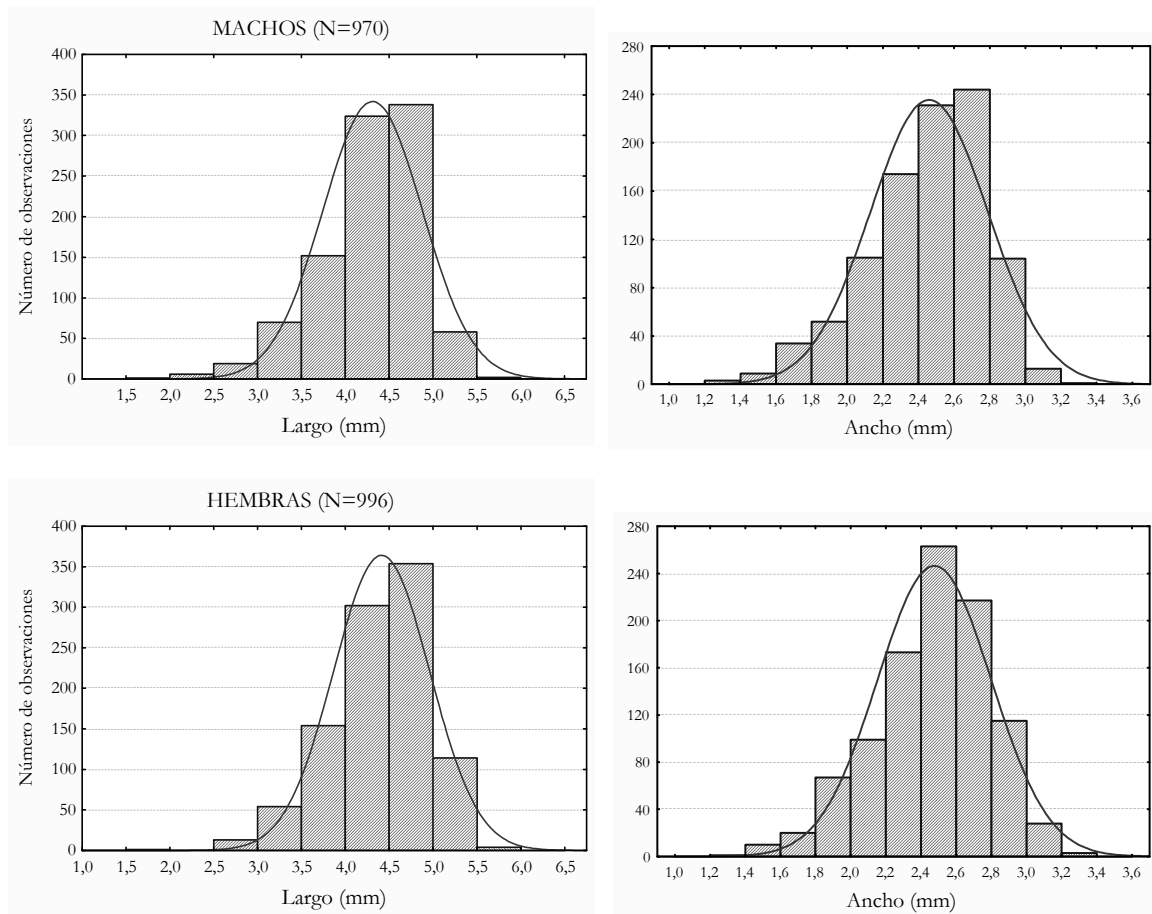




**Figura 53.** *Pissodes castaneus* adulto mimetizado con la corteza de un tronco de *Pinus pinaster* (a), larva (b), cámaras de pupación cerradas (c), orificio de salida en el tronco (d), *P. castaneus* alimentándose sobre una rama y provocando resinación con sus mordeduras (e).

La cabeza del insecto se prolonga en una larga trompa, en cuyo centro se insertan las antenas, que son geniculadas. El protórax es mucho más estrecho en la parte anterior, ensanchándose de adelante hacia atrás. La superficie es rugosa, densamente punteada, con una fina quilla media dorsal y cuatro gruesos puntos formados por escamas blancas. Los élitros presentan cuatro manchas amarillentas, constituidas por escamas. Las dos manchas posteriores son de mayor tamaño y están unidas entre ellas por una franja de escamas blancas (Romanyk & Cadahia 1992).

Este gorgojo está ampliamente distribuido en España (De Viedma 1961; Romanyk & Cadahia 1992), Francia (Alauzet 1984; Lieutier et al. 1997), Portugal (Ferreira & Ferreira 1989), Rusia (Kulinich & Orlinskii 1998), Turquía (Tozlu 2001), Norte de África (Bichão et al. 2003) y Sudamérica (Abgrall et al. 2000).



**Figura 54.** Distribución de tamaños de los machos y hembras de *Pissodes castaneus* utilizando como indicador de tamaño el ancho y largo de los élitros.

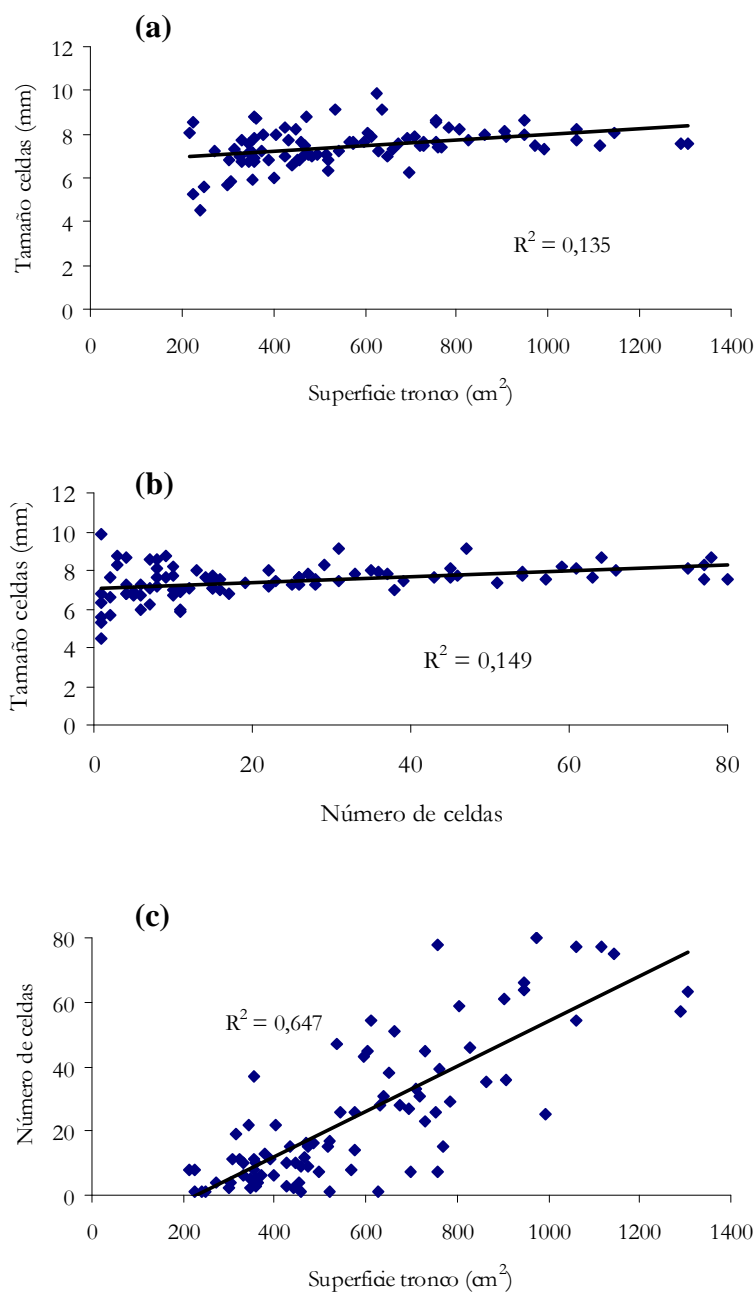
Los huevos son blanquecinos y elipsoidales y son depositados generalmente de forma aislada o en grupos de dos o tres, en el interior de los orificios que las hembras realizan perforando la corteza del árbol con el rostro. Las larvas son blanquecinas, ápodas y ligeramente encorvadas sobre su parte ventral, característica común en los curculiónidos. A partir de la eclosión, las larvas comienzan a horadar galerías subcorticales, en sentido descendente, hasta la llegada del frío, momento en que paralizan su actividad para reanudarla cuando las temperaturas son nuevamente propicias. Las larvas pasan por cuatro

estadios de desarrollo, alcanzando las del último unos 10 mm de longitud (Alauzet 1984). Cuando llega la primavera, la larva de último estadio prepara una cámara de pupación bajo la corteza, excavada en la madera, donde cubriéndose con la viruta extraída (Fig. 53b,c), realiza su metamorfosis, que dura aproximadamente un mes. El imago perfora la viruta de la cámara de pupación y la corteza produciendo un limpio orificio circular por el que sale al exterior (Fig. 53d). Los adultos recién emergidos necesitan un periodo de maduración sexual antes del apareamiento, de unos 13 días de duración (Alauzet 1984).

Este insecto reviste el papel de plaga secundaria ya que ataca preferentemente a individuos jóvenes (4-15 años) de diferentes especies de pinos que se encuentran debilitados por otras circunstancias. Sin embargo, existen datos que sugieren que este gorgojo sea capaz de atacar a árboles sanos, especialmente cuando su densidad de población es elevada (Alauzet 1984). Su ciclo biológico presenta una gran variabilidad fenológica, probablemente debido a su amplia distribución geográfica. La influencia del clima sobre su desarrollo es fundamental, hasta el punto que en los climas muy suaves pueden darse dos generaciones al año, mientras que en los climas muy fríos sólo tiene una generación cada dos años (Romanyk & Cadahia 1992). En general, en España hay dos generaciones solapadas por año. Las primeras puestas realizadas en primavera dan adultos en otoño, que pueden reproducirse antes de la hibernación, produciendo así una nueva generación en la primavera siguiente (Romanyk & Cadahia 1992). En cuanto a su ciclo biológico, estudios de laboratorio muestran que es capaz de desarrollarse sin una diapausa obligatoria (Carle 1967; Alauzet 1984), aunque en estudios de campo se ha observado una diapausa facultativa en el cuarto estadio larvario, posiblemente inducido por las condiciones ambientales, principalmente el fotoperiodo y la temperatura (Carle 1974; Alauzet 1986).

Durante la cría masiva que se ha llevado a cabo en el laboratorio en condiciones de temperatura ambiente (18-20°C), se proporcionaron a los insectos troncos de *P. pinaster* (n=117), con un diámetro medio de  $45,5 \pm 1,8$  mm y una longitud de  $323 \pm 4,9$  mm, para determinar si el número y el tamaño de las celdas de pupación guardaba alguna relación con la superficie del tronco y con el número de celdas de pupación presentes (Fig. 55). Se hipotetizó que la presencia de un gran número de larvas en el mismo tronco pudiera determinar cierta escasez de recursos alimenticios, que podría ocasionar finalmente un tamaño corporal más reducido de los insectos. Los resultados de la regresión lineal indicaron que un incremento de la superficie del tronco determinó un aumento del número de celdas de pupación ( $F = 153.82$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 85$ ). Por otra parte, el tamaño de las

celdas tenía una relación significativa y positiva con la superficie de la madera ( $F = 13.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 85$ ), pero también con el número de celdas presentes en el tronco ( $F = 14.68$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 85$ ). Este último e inesperado resultado sugiere aparentemente la ausencia de competencia entre las larvas por el espacio y el alimento.



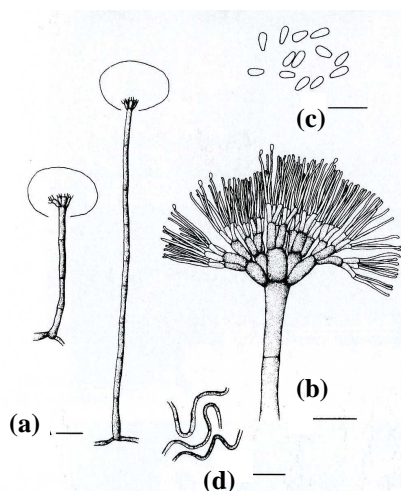
**Figura 55.** Relación entre el tamaño de las celdas de pupación y la superficie de tronco disponible (a), entre el tamaño de las celdas de pupación y el número de celdas presentes en un mismo tronco (b) y relación entre el número de celdas de pupación y la superficie de tronco disponible.

Los adultos son bastante longevos, alcanzando los 20 meses de vida (Romanyk & Cadahia 1992). El gorgojo del pino produce principalmente dos tipos de daño en los árboles: el primero, realizado por los adultos en su fase de alimentación, es de escasa entidad, mientras que el segundo, realizado por las larvas cuando excavan sus galerías, determina la interrupción del flujo de savia y en caso de grandes colonizaciones la muerte del árbol (Alauzet 1984). Este curculiónido ha sido relacionado con varios hongos patógenos como *Armillaria* sp. (Ehnström & Axelsson 2002), *Cronartium flaccidum* (Alb. & Schwein) (Alauzet 1984) y *Ophiostoma* sp. (Lévieux et al. 1994).

### 3.1.1.3. Biología y ecología de *Leptographium serpens* (Goid.) M.J. Wingf.

El hongo *Leptographium serpens* (Goid.) M.J. Wingf. ha sido asociado con algunas patologías que afectan principalmente a la raíz de varias especies de pino: *P. pinea* en Italia (Lorenzini & Gambogi 1976), *P. taeda* en Estados Unidos (Eckhardt et al. 2007), *P. radiata* y *P. pinaster* en Sudáfrica (Wingfield & Knox-Davies 1980), y *P. pinaster* en España (Fernández de Ana Magán 1982). En España, el hongo inicialmente fue identificado y descrito como *Leptographium gallaeciae* (Fernández de Ana Magán 1982), aunque posteriormente se confirmó como *L. serpens* (Zipfel et al. 2006). Este patógeno coloniza el parénquima y las traqueidas y produce el azulado de la madera. Los síntomas más evidentes son la reducción de la longitud de las acículas y su decoloración, la reducción del crecimiento en altura de la planta y el típico oscurecimiento de la madera en tronco y raíces (Wingfield et al. 1988).

El micelio se presenta blanco hialino en su fase de crecimiento inicial y al cabo de cuatro o cinco días se vuelve más oscuro, hasta llegar a oliváceo-negruzco cuando envejece. Las



hifas, con forma serpenteante, son tabicadas con unos septos muy visibles. La estructura reproductora de este hongo se caracteriza por presentar unas formaciones conidiales exógenas situadas sobre los conidióforos erectos, tabicados y con la base fuertemente unida a la madera por la bifurcación del estipe simulando la forma de raíces laterales (Fig. 56). El conidióforo en su parte superior se divide en

**Figura 56.** Estructuras formadas por *Leptographium serpens*. Conidióforo, barra 10 µm (a). Aparato conidiógeno, barra 10 µm (b). Conidios, barra 10 µm (c). Hifas serpenteantes, barra 20 µm (d) (Jacobs & Wingfield 2001).

ramas que, a su vez, se ramifican y sustentan otras hialinas y muy delgadas, en cuyo ápice se sitúan los conidios. El conjunto del conidióforo y los conidios, se encuentra embebido en una gota de un líquido mucilaginoso que adquiere en su conjunto un color grisáceo-blanquecino y fácilmente visible a simple vista. Los conidios son hialinos, cilíndricos y sin septos.

### 3.1.2. Objetivos del estudio

El principal objetivo de la presente investigación es evaluar, bajo condiciones controladas, que tipo de relación ecológica se establece entre el hongo fitopatógeno *L. serpens* y el curculiónido xilófago *P. castaneus*, cuando ambos comparten recursos en la misma planta hospedadora (*P. pinaster*).

En concreto, los objetivos fueron:

- Determinar los beneficios potenciales de *L. serpens* en el desarrollo, reproducción y la alimentación de *P. castaneus*.
- Discernir entre el efecto de las condiciones ambientales y la influencia del patógeno sobre la biología del insecto. Con este fin el experimento se realizó en invierno y en primavera.
- Determinar si el nivel de desarrollo del hongo influye sobre la biología del curculiónido, suministrando a las plantas el hongo y los insectos contemporáneamente o bien a distancia de un mes.

Las hipótesis puestas a prueba fueron las siguientes:

- Si el insecto se beneficia de la presencia del hongo en la planta hospedadora, su descendencia debería ser más numerosa en las plantas inoculadas.
- Si las larvas se benefician al alimentarse del hongo, su desarrollo debería ser más rápido, su mortalidad más baja y su tamaño corporal mayor.
- Si el insecto y el hongo compiten por los mismos recursos, el gorgojo debería reducir su tamaño corporal, aumentaría la mortalidad larvaria, aumentaría el tiempo de desarrollo y se reduciría el número de descendientes en los árboles tratados.

### 3.1.3. Material y Métodos

#### 3.1.3.1. Captura y cría de *Pissodes castaneus*

En el verano de 2007 se capturaron adultos de *P. castaneus* procedentes de una regeneración natural de pino marítimo en la provincia de Pontevedra, muy atacada por este insecto después de un incendio. Los gorgojos se han mantenido en dos insectarios (40 x 40 x 60 cm) de madera y malla metálica (Fig. 57) a temperatura ambiente (18-20°C). Se le proporcionaron semanalmente ramas frescas y troncos de *P. pinaster* para su alimentación. Posteriormente se ha conseguido mantener una cría en el laboratorio, donde *P. castaneus* es capaz de completar su ciclo biológico. Todos los adultos han sido sexados, basándose en la anatomía del último esternito del abdomen (Lavallée et al. 1993). Los gorgojos fueron marcados con pintura no tóxica de distintos colores (Postman, Kuretake Co. Ltd, Japan) para diferenciar los dos sexos.



**Figura 57.** Insectarios instalados en el laboratorio para la cría de *Pissodes castaneus*.

#### 3.1.3.2. Cultivo de *Leptographium serpens*

El hongo fue aislado de árboles de *P. pinaster* (Fig. 58) de la provincia de Pontevedra afectados por incendios ocurridos en 2006, purificado en MEA (Malt Extract Agar) al 2% y mantenido en estufa a 22°C en oscuridad. El cultivo puro fue enviado al Dr. Mike Wingfield, director del FABI (Forestry and Agricultural Biotechnology Institute) de la

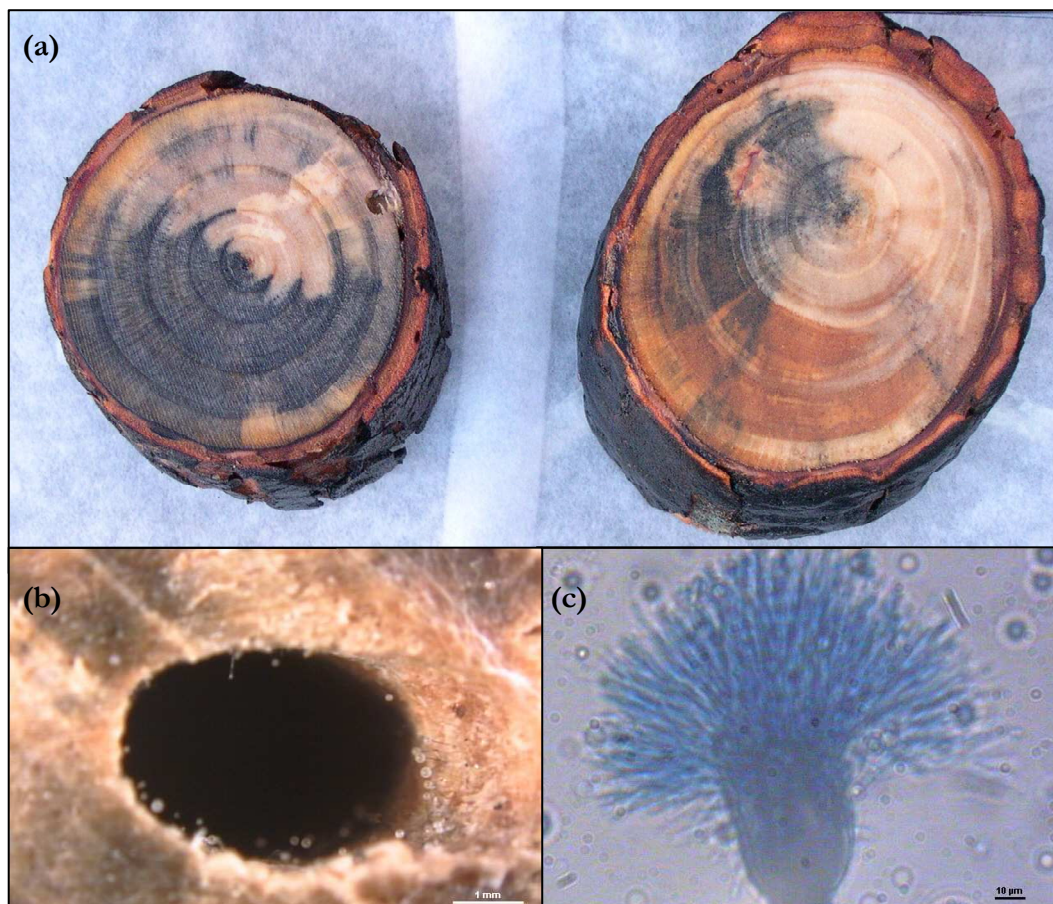
Universidad de Pretoria (Sudáfrica), para su identificación. La cepa aislada para este estudio se encuentra almacenada en la Colección de hongos de la Sección de Fitopatología del Centro de Investigación Forestal de Lourizán (Pontevedra).

### 3.1.3.3. Diseño experimental

El experimento fue llevado a cabo entre el otoño y el invierno de 2007-2008 y luego replicado en la primavera-verano de 2008. En septiembre de 2007, 42 plantas de *P. pinaster* de aproximadamente 5 años de edad y con un diámetro medio de  $38,2 \pm 0,5$  mm, fueron colocadas en el interior de un invernadero en macetas de 45L con un 80% de sustrato y un 20% de perlita. Las plantas fueron distribuidas aleatoriamente entre dos grupos que recibieron distintos tratamientos y en un grupo control (14 réplicas/grupo). En el primer grupo (A), los pinos fueron inoculados con un cultivo puro de *L. serpens* en MEA un mes antes (12-09-07) de introducir los adultos de *P. castaneus* (18-10-07). En el segundo grupo (B), el hongo y los insectos fueron introducidos simultáneamente (18-10-07), mientras que en el grupo control primero se realizaron las inoculaciones con MEA sin el hongo (26-09-07) y luego se colocaron los insectos (18-10-07). En cada tronco se realizaron 10 inoculaciones (Fig. 59), a lo largo de 1 m, en dos filas opuestas de 5 inoculaciones cada una. Las inoculaciones de las plantas se realizaron primero eliminando  $1 \text{ cm}^3$  de madera con una barrena (Suunto, Finland), añadiendo después el inóculo del hongo en el agujero, recubriendo con la misma madera extraída con la barrena, y sellando finalmente con parafilm para evitar contaminaciones.

Los insectos fueron introducidos en los 42 árboles el 18 de octubre de 2007, colocados en bolsas de fibra de vidrio atadas en las extremidades alrededor del tronco. En cada bolsa se introdujeron 5 hembras y 5 machos de *P. castaneus* (Fig. 59). Los insectos se mantuvieron sobre la planta durante dos meses y fueron retirados el 18 de diciembre de 2007. Durante la primavera-verano de 2008, el experimento fue replicado utilizando plantas nuevas. En este caso el grupo A fue inoculado el 14 de abril, el grupo B el 14 de mayo y el grupo control el 29 de abril. Los insectos fueron colocados en las bolsas desde el 14 de mayo hasta el 14 de julio. La temperatura y la humedad relativa dentro del invernadero fueron registradas con un Datalogger Tinytag (Gemini Data Loggers Ltd., Chichester, West Sussex, U.K.). También se tomó nota de la supervivencia de los árboles experimentales.





**Figura 58.** Sección de un tronco de *Pinus pinaster* infectado por *Leptographium serpens* (a). Conidióforos examinados al estereomicroscopio, barra 1 mm (b) y al microscopio, barra 10 µm (c).

Las bolsas fueron revisadas diariamente para verificar la fecha de emersión de la descendencia. Los adultos de la nueva generación se llevaron al laboratorio, donde fueron contados, medidos y sexados, anotando además el código de la planta hospedadora. Para cada árbol se calculó: 1) el tiempo de desarrollo de cada adulto de la nueva generación, 2) el número total de gorgojos emergidos, 3) la tasa de mortalidad de las larvas de último estadio, 4) la proporción de sexos (proporción de machos sobre el total) de los adultos y, 5) su tamaño corporal. El tiempo de desarrollo de la progenie se estimó como la diferencia entre la fecha de colocación de los insectos progenitores en las bolsas y la fecha de emergencia de cada miembro de la progenie de su celda de pupación. Para determinar el tamaño de cada adulto se midió el ancho y el largo de los élitros con un calibre digital (Comecta S.A., Barcelona, España). Para determinar la mortalidad de las larvas se

descortezó el tronco y se contaron las celdas de pupación abiertas y cerradas. El cálculo se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Mortalidad larvaria} = \frac{n^{\circ} \text{ celdas cerradas}}{(n^{\circ} \text{ celdas cerradas} + n^{\circ} \text{ celdas abiertas})}$$



**Figura 59.** Inoculaciones de *Leptographium serpens* recubiertas con parafilm (a), colocación de las bolsas de malla (b-c), adultos de *P. castaneus* (d), introducción de los adultos y cierre de las bolsas (e-f) y visión general de las plantas de *Pinus pinaster* utilizadas en el experimento (g).

Por otra parte también se determinó el contenido en nitrógeno y fósforo del floema para comprobar si la inoculación del hongo modifica la concentración de estos nutrientes en el

tronco. Para cada árbol se cortó una muestra del tronco, que fue secada en estufa a 80°C y luego triturada finamente antes de ser analizada. El porcentaje del nitrógeno total se determinó con el método estándar micro-Kjeldhal, mientras que el fósforo se evaluó con el método colorimétrico de la sulfito-hidroquinona.

La humedad residual en la muestra se determinó después del secado a 105 °C durante 24 h según la fórmula:

$$H(\%) = \left[ \frac{Ph - Ps}{Ph - Pc} \right] \times 100$$

donde  $Ph$  es el peso de la cápsula y la muestra húmeda y  $Ps$  es peso de la cápsula y la muestra seca y  $Pc$  es el peso de la cápsula. El dato de humedad se utilizó para calcular el porcentaje de nitrógeno según la fórmula:

$$\%N \text{ calculado} = \%N \frac{100}{100 - H}$$

#### 3.1.3.4. Análisis estadísticos

Antes de proceder con los análisis estadísticos, todas las variables fueron analizadas mediante el test Kolmogorov-Smirnov para comprobar si presentan una distribución normal y así determinar el tipo de análisis más adecuado.

Para analizar el efecto del tratamiento y del sexo del insecto sobre el tiempo de desarrollo se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), utilizando los árboles como factor aleatorio. Para comprobar si el tamaño del cuerpo varía entre tratamientos y entre sexos, se utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA). La fecha de emergencia fue incluida como covariable ya que esta generalmente afecta el tamaño del insecto (observación personal). Como en el caso anterior, los árboles se utilizaron como factor aleatorio. Las comparaciones dos a dos entre las medias se realizaron utilizando el test LSD de Fisher (Least Significant Differences).

El efecto del tratamiento sobre la proporción de sexos de la progenie y la mortalidad larvaria se analizó utilizando el modelo lineal generalizado o GLM (generalized linear model) con distribución binomial y función *logit link*. El efecto de los tratamientos sobre el número de descendientes fue analizado con un GLM con distribución de Poisson y función *logarithm link*. Las diferencias entre tratamientos en cuanto a concentración de nitrógeno y fósforo fueron analizadas con un analisis de varianza (ANOVA). El contenido

de fósforo fue previamente transformado aplicando la fórmula  $[(x - (-0.6)) - 1] / -0.6$ . Para comprobar el efecto de la estación en todas las variables estudiadas para cada grupo se aplicó un GLM con distribución de Poisson y función *logarithm link*. El nivel de significación se estableció en  $P \leq 0.05$ . El software estadístico que se utilizó fue el GenStat 11.1 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, U.K.).

#### 3.1.4. Resultados

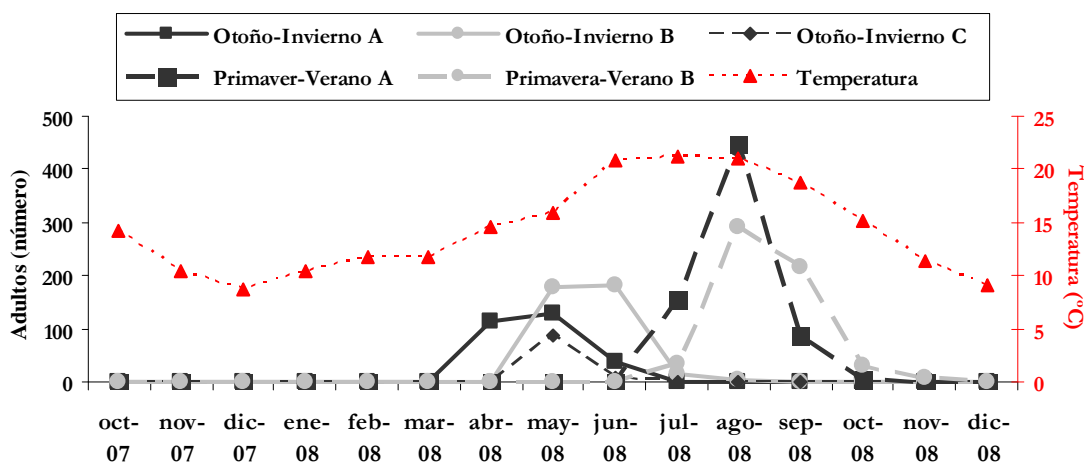
##### 3.1.4.1. Tratamiento en otoño-invierno

Durante este periodo emergieron un total de 755 adultos de *P. castaneus*: 95 en el grupo control, 281 en el grupo A y 379 en el grupo B. La concentración de larvas en algunos casos fue muy alta ya que en un solo árbol se llegaron a contar hasta 95 orificios de salida. En la Figura 60 aparece el patrón de emergencia durante ambas estaciones. Desde octubre hasta marzo de 2007, la temperatura media osciló entre 8,7 y 14,2°C, con una humedad relativa media del 87,9%. En particular, durante el mes de enero la temperatura media a menudo cayó por debajo de 5°C durante la noche. Los adultos del grupo A empezaron a emerger el 3 de abril de 2008, aproximadamente un mes antes que los adultos del grupo B que fueron encontrados a partir del 30 abril de 2008. El grupo control empezó a emerger el 5 de mayo de 2008.

Con respecto a la mortalidad de los árboles, sólo un individuo del grupo control murió a causa de un ataque de áfidos. En el grupo A murieron 12 árboles y la totalidad en el grupo B. En el grupo control sólo emergieron adultos del árbol afectado por los áfidos. El tratamiento aplicado a los árboles afectó significativamente al tiempo de desarrollo de los insectos ( $F_{2,752} = 19.79$ ,  $P < 0.001$ ), pero no presentó variaciones en función del sexo ( $F_{1,749} = 0.08$ ,  $P = 0.772$ ). Las diferencias entre tratamientos se muestran detalladamente en la Tabla 14. El tiempo de desarrollo en el grupo A más fue corto que en los otros grupos y no se detectaron diferencias significativas entre los adultos del grupo control y los del grupo B.

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la longitud de los adultos (tratamiento:  $F_{2,751} = 6.55$ ,  $P = 0.002$ ; covariable:  $F_{1,751} = 33.99$ ,  $P < 0.001$ ). Sin embargo, los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre el ancho del cuerpo (tratamiento:  $F_{2,751} = 2.51$ ,  $P = 0.082$ ; covariable:  $F_{1,751} = 77.36$ ,  $P < 0.001$ ). En la Figura 61 se puede observar la resinación provocada por las mordeduras de *Pissodes castaneus* y orificios de salida marcados en amarillo.

Juntando los datos de todos los tratamientos, las hembras resultaron ser un 2% más largas ( $n = 372, 4.32 \pm 0.02$  mm) que los machos ( $n = 385, 4.23 \pm 0.02$  mm) (sexo:  $F_{1,752} = 4.68, P = 0.031$ ; covariable:  $F_{1,752} = 80.95, P < 0.001$ ). No se observó la misma tendencia para el ancho, donde no se detectaron diferencias significativas entre sexos (machos =  $2,427 \pm 0,01$  mm; hembras =  $2,416 \pm 0,01$  mm) (sexo:  $F_{1,752} = 0.25, P = 0.618$ ; covariable:  $F_{1,752} = 77.05, P < 0.001$ ).



**Figura 60.** Relación entre el tiempo, la temperatura del aire y la emergencia de los adultos en las dos estaciones. A = hongo inoculado un mes antes de introducir los insectos. B = hongo e insecto colocados al mismo tiempo.

Los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre la mortalidad de las larvas (deviance ratio = 0.54,  $P = 0.592$ ), ni sobre la proporción de sexos de la descendencia (deviance ratio = 0.26,  $P = 0.774$ ), mientras que sí hubo un efecto significativo sobre el número de adultos en la descendencia (deviance ratio = 93.60,  $P < 0.001$ ), especialmente debido al fracaso en la reproducción de las hembras del grupo control.

Los tratamientos afectaron significativamente al contenido de nitrógeno en el floema ( $F_{2,39} = 4.21, P = 0.022$ ). Las plantas del grupo control y el grupo A presentaron la concentración de nitrógeno en el floema más alta, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 62a). El contenido de fósforo también varió según el tratamiento ( $F_{2,39} = 6.46, P = 0.004$ ) (Fig. 62b). En comparación con el grupo control, el contenido de fósforo en el grupo A y en el grupo B se incrementó un 46,7% y un 67,6%, respectivamente. Estos resultados indicaron la existencia de una relación entre los tratamientos y el contenido de nutrientes en el floema. Por esta razón se realizó a posteriori un ANCOVA utilizando el

tratamiento como factor fijo, la descendencia, el tiempo de desarrollo o el tamaño corporal como variables de respuesta, el contenido de nitrógeno y fósforo como covariables y los árboles como un factor aleatorio. Al analizar el efecto de los tratamientos sobre el tamaño corporal, se ha utilizado la fecha de emergencia como segunda covariable.



**Figura 61.** Resinación provocada por las mordeduras de *Pissodes castaneus* y orificios de salida marcados en amarillo.

El nitrógeno contribuyó a explicar el efecto del tratamiento sobre la longitud (tratamiento:  $F_{1,656} = 0.88$ ,  $P = 0.349$ ; contenido de nitrógeno:  $F_{1,656} = 9.06$ ,  $P = 0.003$ ; fecha de emergencia:  $F_{1,656} = 33.34$ ,  $P < 0.001$ ) y el ancho de los insectos (tratamiento:  $F_{1,656} = 0.38$ ,  $P = 0.540$ ; contenido de nitrógeno:  $F_{1,656} = 16.39$ ,  $P < 0.001$ ; fecha de emergencia:  $F_{1,656} = 39.79$ ,  $P < 0.001$ ). El contenido de fósforo tuvo un efecto positivo sobre la descendencia (tratamiento:  $F_{1,656} = 22.75$ ,  $P = 0.004$ ; contenido de fósforo:  $F_{1,656} = 54.26$ ,  $P < 0.001$ ), la longitud (tratamiento:  $F_{1,656} = 6.00$ ,  $P = 0.015$ ; contenido de fósforo:  $F_{1,656} = 25.32$ ,  $P < 0.001$ ; fecha de emergencia:  $F_{1,656} = 34.58$ ,  $P < 0.001$ ) y el ancho de los insectos (tratamiento:  $F_{1,656} = 1.45$ ,  $P = 0.229$ ; contenido de fósforo:  $F_{1,656} = 35.28$ ,  $P < 0.001$ ; fecha de emergencia:  $F_{1,656} = 41.79$ ,  $P < 0.001$ ).

#### 3.1.4.2. Tratamiento en primavera-verano

En este caso emergieron un total de 1207 adultos de *P. castaneus*: 1 en el grupo control, 694 en el grupo A y 512 en el grupo B. En un solo árbol se llegaron a contabilizar hasta 94

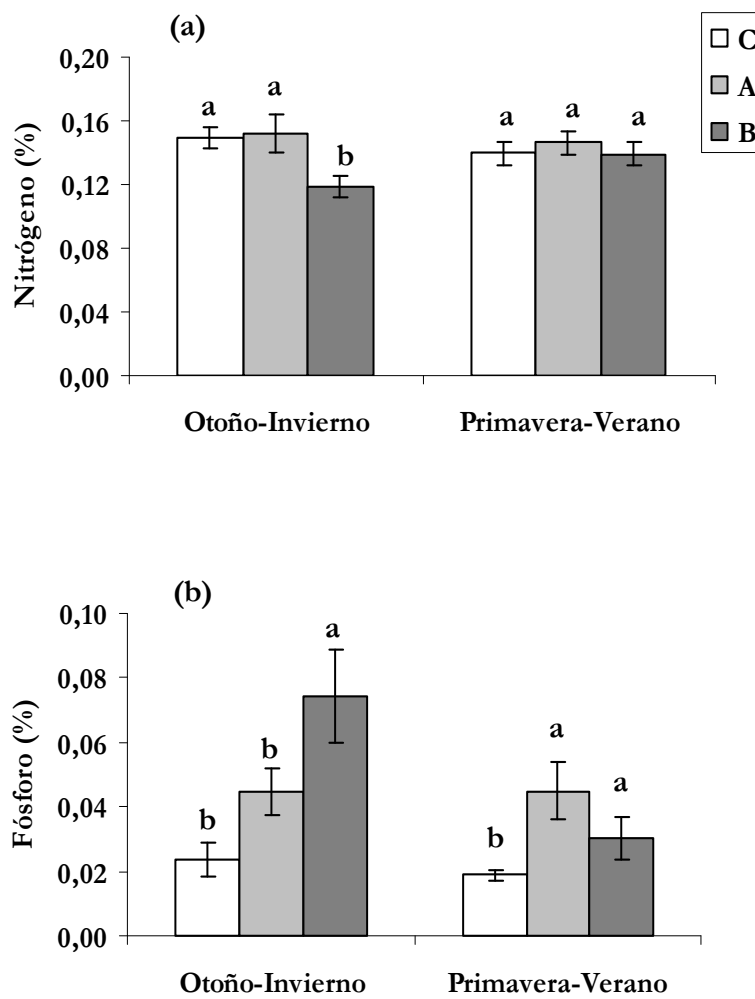
orificios de salida. La temperatura del aire desde abril hasta septiembre de 2008 osciló entre 14,6°C y 21,1°C, con una humedad relativa media del 83,3%. Sólo sobrevivieron dos plantas del grupo A y cinco del grupo B. En el grupo control ninguna planta murió y sólo emergió 1 insecto (Tabla 15), por eso en los análisis sólo se pudieron comparar los grupos A y B.

El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el tiempo de desarrollo ( $F_{2,1183} = 7.92$ ,  $P = 0.002$ ). Los adultos que pertenecían al grupo A experimentaron un desarrollo más rápido, aunque el tiempo de desarrollo fue similar para ambos sexos ( $F_{1,1182} = 0.71$ ,  $P = 0.398$ ). Analizando los tratamientos teniendo en cuenta la fecha de emergencia como covariable, se encontró un efecto significativo sobre la longitud (tratamiento:  $F_{1,1207} = 36.97$ ,  $P < 0.001$ ; covariable:  $F_{1,1207} = 20.70$ ,  $P < 0.001$ ) y ancho del insecto (tratamiento:  $F_{1,1207} = 53.63$ ,  $P < 0.001$ ; covariable:  $F_{1,1207} = 34.58$ ,  $P < 0.001$ ). Los adultos que emergieron en el grupo B tenían un mayor tamaño que los adultos que emergieron en el grupo A (Tabla 15).

Considerando los datos de todos los tratamientos, las hembras resultaron ser un 2% más largas ( $n = 625$ ,  $4,44 \pm 0,01\text{mm}$ ) que los machos ( $n = 586$ ,  $4,34 \pm 0,01\text{mm}$ ) (sexo:  $F_{1,1207} = 12.96$ ,  $P < 0.001$ ; covariable:  $F_{1,1207} = 3.72$ ,  $P = 0.054$ ), mientras que el ancho no varió (machos =  $2,48 \pm 0,01\text{mm}$ , hembras =  $2,49 \pm 0,01\text{mm}$ ) (sexo:  $F_{1,1207} = 1.36$ ,  $P = 0.244$ ; covariable:  $F_{1,1207} = 6.88$ ,  $P = 0.009$ ). Los tratamientos no tuvieron efecto sobre la proporción de sexos (deviance ratio = 0.05,  $P = 0.825$ ), la mortalidad larvaria (deviance ratio = 0.28,  $P = 0.756$ ) y el número de descendientes (deviance ratio = 0.93,  $P = 0.343$ ), sin embargo la comparación dos a dos de las medias muestra que el número de descendientes por árbol fue mayor en el grupo A (Tabla 15).

Durante la primavera-verano los tratamientos no afectaron significativamente al contenido de nitrógeno en el floema ( $F_{2,32} = 0.33$ ,  $P = 0.723$ ), mientras que el contenido de fósforo varió según el tratamiento ( $F_{2,32} = 3.13$ ,  $P = 0.055$ ). En comparación con el grupo control, el contenido de fósforo en el grupo A y en el grupo B se incrementó un 57,8% y un 36,7% respectivamente, existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos (Fig.62b). Como ya ocurrido para el tratamiento durante el invierno, los resultados indicaron una relación entre los tratamientos y el contenido de fósforo en el floema. Se ha aplicado entonces un ANCOVA, en donde el tratamiento es un factor fijo, la descendencia, el tiempo de desarrollo o el tamaño son las variables de respuesta, el contenido fósforo es la covariable y los árboles representan el factor aleatorio. Al analizar el efecto de los

tratamientos sobre el tamaño corporal, se utilizó la fecha de emergencia como segunda covariable. Se encontró que el contenido de fósforo en el floema tuvo un efecto significativo únicamente sobre el número de descendientes (tratamiento:  $F_{1,1270} = 105.24$ ,  $P < 0.001$ ; contenido de fósforo:  $F_{1,1270} = 119.80$ ,  $P < 0.001$ ).



**Figura 62.** Contenido de nitrógeno y fósforo en los árboles experimentales durante las dos estaciones. C = Control; A = Hongo inoculado un mes antes de colocar los insectos; B = Hongo e insecto introducidos al mismo.



### 3.1.4.3. Efecto estacional

La época del año tuvo un efecto significativo sobre el tiempo de desarrollo (deviance ratio = 9024.09,  $P < 0.001$ ) y el número de descendientes (deviance ratio = 68.90,  $P < 0.001$ ). Durante la primavera los adultos del grupo A tuvieron más progenie que durante el invierno, y el tiempo de desarrollo fue más rápido (Tabla 15).

También se encontró que la mortalidad de las larvas fue mayor durante el invierno que durante la primavera (deviance ratio = 22.27,  $P < 0.001$ ). La estación también tuvo un efecto significativo sobre el ancho (deviance ratio = 17.86,  $P < 0.001$ ) y largo (deviance ratio = 21.70,  $P < 0.001$ ) de los adultos, ya que fueron más grandes los adultos que emergieron en primavera. La proporción de sexos no varió entre estaciones (deviance ratio = 1.21,  $P = 0.317$ ).

Por otro lado, la época del año no influyó sobre el contenido de nitrógeno de la planta ( $F_{1,78} = 0.07$ ,  $P = 0.787$ ), pero sí sobre el contenido en fósforo ( $F_{1,78} = 5.60$ ,  $P = 0.020$ ), que fue mayor durante los meses invernales (Fig. 62b).

**Tabla 15.** Valores medios de las variables medidas en la descendencia durante las dos estaciones (media  $\pm$  error estandar). (n) = tamaño de muestra

Otoño-Invierno						
Grupo	Ancho (mm)	Largo (mm)	Tiempo desarrollo (días)	Descendencia (adultos/árbol)	Proporción sexos	Mortalidad larvaria
<b>C</b> (n=95)	2,38 $\pm$ 0,03 (b)	4,17 $\pm$ 0,53 (b)	214 $\pm$ 0,68 (b)	6,8 (b)	0,47 (a)	0,04 (a)
<b>A</b> (n=281)	2,53 $\pm$ 0,02 (a) (a)	4,48 $\pm$ 0,04 (a) (a)	203 $\pm$ 1,04 (c) (a)	20,1 $\pm$ 5,6 (a) (b)	0,34 (a) (a)	0,04 $\pm$ 0,01 (a) (a)
<b>B</b> (n=379)	2,35 $\pm$ 0,02 (b) (b)	4,15 $\pm$ 0,03 (b) (b)	229 $\pm$ 0,89 (a) (a)	27,1 $\pm$ 5,6 (a) (a)	0,46 (a) (a)	0,04 $\pm$ 0,01 (a) (a)

Primavera-Verano						
Grupo	Ancho (mm)	Largo (mm)	Tiempo desarrollo (días)	Descendencia (adultos/árbol)	Proporción sexos	Mortalidad larvaria
<b>C</b> (n=1)	1,86	2,92	76	1		
<b>A</b> (n=697)	2,45 $\pm$ 0,01 (b) (b)	4,34 $\pm$ 0,02 (b) (b)	91 $\pm$ 0,57 (b) (b)	49,8 $\pm$ 9,4 (a) (a)	0,41 (a) (a)	0,004 $\pm$ 0,01 (a) (b)
<b>B</b> (n=585)	2,54 $\pm$ 0,01 (a) (a)	4,47 $\pm$ 0,02 (a) (a)	110 $\pm$ 0,88 (a) (b)	36,6 $\pm$ 7,4 (b) (a)	0,57 (a) (a)	0,007 $\pm$ 0,04 (a) (b)

Grupo A = hongo inoculado un mes antes de colocar los insectos. Grupo B = hongo e insectos colocados al mismo tiempo. C = árboles inoculados con medio de cultivo estéril. Las mismas letras entre paréntesis indican que no hay diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). Las primeras letras indican diferencias entre tratamientos dentro de la misma estación, la segunda letra indica diferencias entre estaciones para la misma variable y tratamiento.

### 3.1.5. Discusión

En este estudio se examinaron las interacciones ecológicas entre el gorgojo xilófago *Pissodes castaneus* y el hongo patógeno *Leptographium serpens*, cuando ambos colonizan la misma planta hospedadora. Se hipotetizó la existencia de cierta variabilidad del efecto del hongo sobre el insecto en función del nivel de desarrollo del micelio. Para ello se determinaron dos grupos con distintos niveles de colonización fúngica: en el primero el hongo fue inoculado un mes antes de la introducción de los insectos (grupo A) y en el segundo la inoculación fue simultánea con la colocación de los insectos (grupo B).

Durante la colonización de la planta, un hongo fitopatógeno puede modificar el metabolismo de esta reduciendo sus mecanismos de defensa para poder acceder a las fuentes de carbono y nitrógeno y desarrollarse en los tejidos del hospedador (Solomon et al. 2003). Ayres et al. (2000) demostraron la importancia del nitrógeno en la alimentación de las larvas de *Dendroctonus frontalis* generalmente asociado con hongos patógenos. De hecho, se encontró que la concentración de nitrógeno en el floema pasaba del 0,40% en los árboles no atacados por el insecto al 0,86% en los árboles que presentaban galerías y larvas bien desarrolladas. Además, en las zonas con mayor concentración de nitrógeno, asociadas con el crecimiento de los hongos simbios, *Ceratocystiopsis ranunculosis* y *Entomocorticium* sp., las larvas se desarrollaban con más éxito y los adultos tenían un mayor tamaño corporal. Sin embargo, cuando el floema era colonizado por el hongo *Ophiostoma minus*, antagonista de *D. frontalis*, aumentaba la concentración de nitrógeno con respecto a los árboles no atacados por el insecto, pero no había larvas en desarrollo. Se ha encontrado un incremento de la concentración de fósforo en las plantas inoculadas, especialmente durante el invierno, lo cual sugiere que el hongo determina la concentración de este nutriente. En comparación con el grupo control, el contenido de fósforo del grupo A y B se incrementaron del 46,7% y 67,6%, respectivamente. Esta circunstancia contribuyó a explicar el incremento de la progenie en primavera y verano y el tamaño de los adultos desarrollados durante el invierno. Sin embargo, aunque la relación entre los tratamientos y el contenido de nitrógeno fue significativa, en realidad la concentración de nitrógeno no se incrementó como estaba previsto, aunque contribuyó en parte a explicar el impacto del tratamiento sobre el tamaño corporal durante el invierno. Está claro que un suplemento nutricional podría beneficiar a las larvas, ya que aumentaría la calidad de su dieta y reduciría la competencia intraespecífica en árboles intensamente colonizados (Bleiker & Six 2007).

A diferencia de otros insectos xilófagos como *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolitydae) que colonizan árboles sanos, *P. castaneus* generalmente ataca a árboles con algún tipo de estrés biótico o abiótico (Alauzet 1984). Los datos del experimento corroboran esta hipótesis, ya que la descendencia generada por *P. castaneus* fue mucho mayor en los árboles inoculados. Esto sugiere que el hongo ayuda al insecto a debilitar las defensas de las plantas y favorece su desarrollo. Además es interesante resaltar que en los árboles en donde el hongo estaba más desarrollado (grupo A), la descendencia en primavera fue mayor. Estos hechos contrastan con el trabajo de Klepzig et al. (2001), que encontraron que el hongo *Ophiostoma minus* reducía el desarrollo de la descendencia, pero concuerdan con otros estudios en donde los insectos producían más prole en presencia de hongos patógenos (Eckhardt et al. 2004; Kopper et al. 2004). De hecho, Eckhardt et al. (2004) concluyó que *Hylastes salebrosus* e *H. tennis* tenían más descendencia en las raíces que estaban infectadas con hongos del género *Leptographium*.

Cuando el área colonizada por el hongo se solapa con el área donde se ubican las larvas, el éxito de desarrollo de los insectos xilófagos podría verse reducido a través de la inhibición de la eclosión, retraso en el crecimiento o incremento de la mortalidad (Klepzig et al. 2001). En el estudio no se ha observado ninguna forma de antagonismo, ya que la mortalidad de las larvas fue mínima durante ambas estaciones, y no se relacionó con los tratamientos. Sin embargo, la mortalidad se incrementó ligeramente en invierno, seguramente debido a las condiciones ambientales menos favorables. Es importante resaltar que sólo se ha podido detectar la mortalidad de las larvas que llegaron a desarrollar la cámara de pupación, ya que estas dejan una marca evidente en el tronco. La mortalidad de los huevos o de los primeros estadios larvarios que probablemente se produzcan por los mecanismos de defensa del árbol (Franceschi et al. 2005), no pudieron ser detectados.

En condiciones naturales la proporción de sexos de *P. castaneus* es de 1:1 (Alauzet 1984). En el estudio se obtuvo la misma proporción de sexos en la descendencia. Esto indica que la presencia del hongo patógeno en el floema no provoca una mortalidad sesgada hacia uno de los sexos.

La mayoría de los organismos ectotérmicos, como los artrópodos, se desarrollan más lentamente en ambientes fríos y presentan un mayor tamaño que en ambientes cálidos. Esta plasticidad adaptativa podría deberse a los grandes beneficios y a los bajos costes de retrasar la maduración de las larvas en condiciones de bajas temperaturas (Angilletta et al.

2004). Sin embargo, durante el invierno, los adultos que emergieron de las plantas en donde el hongo estaba más desarrollado (grupo A) eran más grandes que los adultos que emergieron de los árboles en donde el hongo estaba menos desarrollado (grupo B), pero experimentaron un desarrollo más rápido. Una causa posible de este fenómeno podría encontrarse en el hecho de que cuando la colonización del hongo está más avanzada (grupo A) hay más nutrientes disponibles para el desarrollo de las larvas. Estos resultados concuerdan con otros estudios que demostraron como la presencia del hongo en la dieta del insecto juega un importante papel en sus parámetros vitales y en la dinámica de la población (Campbell & Bryant 1940; Mondy et al. 1998; Bleiker & Six 2007).

Durante la primavera, los insectos del grupo A se desarrollaron más rápidamente aunque el tamaño del cuerpo se redujo en comparación con los adultos del mismo tratamiento emergidos en invierno y con los adultos pertenecientes al grupo B (Tabla 15). Este resultado podría relacionarse con los diferentes tiempos de desarrollo experimentados por las larvas del grupo A durante el invierno (203 días) y la primavera (91 días). Es posible que, a pesar de que los insectos del grupo A se desarrollaron en un floema ampliamente colonizado por el hongo, el menor tiempo de permanencia de las larvas en el floema no les permitió obtener mayores beneficios en términos de tamaño corporal. Además ha sido reconocido que la temperatura, la humedad y el contenido de nutrientes del floema, modulan la dirección y la fuerza de la relación hongo patógeno-insecto xilófago en la misma planta hospedadora (Klepzig & Six 2004; Six & Bentz 2006; Bleiker & Six 2007).

Analizando el efecto de las estaciones sobre el ciclo de vida de *P. castaneus*, se ha encontrado que, como era previsible, el desarrollo fue más lento en invierno que en primavera. Esto es debido a que las bajas temperaturas provocan que las larvas de *P. castaneus* experimenten una diapausa para sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables (García de Viedma 1961; Alauzet 1984). Sin embargo, la tendencia del tiempo de desarrollo larvario detectada entre tratamientos no cambió, ya que independientemente de la estación, la descendencia del grupo A tuvo un desarrollo más rápido, mostrando un claro efecto del hongo patógeno sobre el tiempo de desarrollo del insecto. Las consecuencias ecológicas de este hecho podrían ser muy importantes para el, ya que un rápido desarrollo reduciría la mortalidad causada por los enemigos naturales, como parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos (Rostás & Hilker 2002).

Para concluir, independientemente de la estación, *L. serpens* no ha manifestado efectos negativos sobre la biología de *P. castaneus*. Por el contrario, el insecto se ha beneficiado de la presencia del hongo patógeno, ya que ha conseguido superar las defensas de la planta, desarrollándose más rápidamente, e incrementando en ocasiones su tamaño corporal. Además, esta investigación demuestra la importancia de replicar los experimentos en diferentes épocas del año (invierno vs. primavera) y con distintas condiciones de tratamiento (colonización simultánea vs. retraso en la colonización del insecto) (Kelly 2006). De hecho tal como se ha demostrado en estudios realizados sobre otros insectos xilófagos (Kopper et al. 2004), se ha comprobado que el grado de colonización del hongo afecta significativamente a la biología los insectos. Por consiguiente la interpretación del impacto de *L. serpens* sobre *P. castaneus* difiere en función de la estación del año y del momento de la inoculación del hongo.

### **3.2. Capacidad de *Pissodes castaneus* para transportar e inocular esporas de *Leptographium serpens* en plantas de *Pinus pinaster***

#### **3.2.1. Introducción**

Las investigaciones sobre la capacidad de los insectos xilófagos para actuar como vectores de hongos patógenos se han centrado principalmente en los escolítidos, por lo que la información sobre la existencia de tales interacciones entre los coleópteros curculiónidos y los hongos ha recibido menor atención (Lieutier et al. 2004). En realidad a diferencia de los insectos xilemicetófagos, pocos curculiónidos han desarrollado una verdadera asociación mutualista con los hongos fitopatógenos (Bright 1993) y como consecuencia, no han desarrollado estructuras especializadas (micangios), para el transporte de las esporas. Sin embargo se ha hipotetizado que en algunos casos los curculiónidos podrían ser más importantes en la propagación de ciertos hongos de la familia Ophiostomataceae, como *Leptographium procerum*, que los escolítidos (Lewis & Alexander 1986). En los curculiónidos, la transmisión del hongo está relacionada con la actividad de alimentación, ya que el insecto perfora con el aparato bucal la corteza hasta llegar al floema. Además durante la emergencia de los adultos de las cámaras de pupación, la mayoría se contamina internamente mediante la ingestión de madera infectada y externamente por contacto directo con las esporas. En *Hyllobius abietis* por ejemplo las esporas de *L. procerum* fueron detectadas a ambos lados del pronoto y en depresiones de la cutícula asociadas a las sedas del pronoto, mientras que en

*Pissodes piceae* fueron localizadas en el pronoto, los élitros y el rostro (Viiri 2004). Por otra parte los ácaros presentes en los escolítidos y curculiónidos también pueden actuar como vectores indirectos de hongos patógenos (Paine et al. 1997; Klepzig et al. 2001; Jacobs & Wingfield 2001), tal y como se ha demostrado para los ácaros de *Ips typographus* e *I. sexdentatus* (Bridges & Moser 1986; Moser et al. 1989; Léveux et al. 1989) y de *Dendroctonus frontalis* (Lombardero et al. 2003).

Según Leach (1940) un insecto puede ser considerado vector de un hongo si se cumplen las siguientes condiciones: 1) en condiciones naturales el insecto está asociado con plantas infectadas por el hongo, 2) visita y transmite la enfermedad a árboles sanos susceptibles de recibir la infección, 3) transporta al hongo sobre su cuerpo y 4) es capaz de transmitir el hongo a plantas sanas en condiciones de laboratorio (Leach 1940). La mayor parte de los estudios que han analizado la capacidad de los curculiónidos para actuar como vectores de hongos han sido realizados en Norteamérica, mientras que en Europa las investigaciones son todavía escasas (Viiri 2004). En Francia, se ha encontrado que un 10% de los adultos de *Pissodes piceae* Illiger llevaban esporas de *Ophiostoma canum* y *O. ips* (Léveux et al. 1994) en el pronoto, los élitros y el rostro. También se documentó que *O. minus*, *O. pini*, *O. piceae*, *O. pluriannulata*, *Ceratocystis minuta* y *Aureobasidium pullulans* estaban asociados con *Pissodes pini* (Viiri 2004). Adultos de *Hylobius pales* inoculados artificialmente con *L. procerum* transmitieron el hongo a todas las plantas y el hongo fue recuperado sólo de las zonas donde el insecto se había alimentado (Nevill & Alexander 1992). También se demostró que *Pissodes pini* transporta esporas de *Endocronartium pini* y además fue capaz de transmitirlo a plantas sanas (Pappinen & von Weissenberg 1994). Recientemente se vió que *Pissodes validirostris* no fue capaz de transmitir el hongo patógeno *Fusarium circinatum* bajo condiciones de laboratorio, sin embargo los daños ocasionados por su aparato bucal facilitaron sucesivamente la penetración del hongo en la planta hospedadora (Lennox et al. 2009).

Como ya se ha comentado anteriormente, los curculiónidos se suelen asociar con hongos de la familia Ophiostomataceae, principalmente con los géneros *Ophiostoma* y *Ceratocystis* y sus anamorfos (*Leptographium*, *Pesotum*, *Sporothrix* y *Hyalorhinocladiella*) (Raffa & Klepzig, 1992). En el caso de *Leptographium* sp. en ocasiones se ha demostrado que el hongo es utilizado como alimento por las larvas del insecto y favorece su desarrollo (Witcosky & Hansen 1985; Lewis & Alexander 1986; Paine et al. 1997). En particular, *L. serpens* ha sido

relacionado con los curculiónidos de los géneros *Hylobius* y *Pissodes* (Jacobs & Wingfield 2001).

### 3.2.2. Objetivos del estudio

En el anterior estudio se ha demostrado que *P. castaneus* y *L. serpens* podrían establecer una relación de comensalismo en *P. pinaster*, ya que el hongo favoreció la colonización y el desarrollo larvario del insecto, disminuyó el tiempo de desarrollo, incrementó el tamaño corporal y aumentó la concentración de fósforo en el floema. Mientras que el insecto se vió favorecido por esta interacción, quedan por demostrar los beneficios obtenidos por el hongo.

Los objetivos principales de este estudio fueron:

- Determinar la capacidad del insecto adulto para transportar esporas del hongo al emerger de plantas de *P. pinaster* infectadas artificialmente.
- Determinar la capacidad del insecto para inocular el hongo en plantas sanas de *P. pinaster*.
- Determinar en condiciones naturales el porcentaje de adultos de *P. castaneus* que transportan esporas de *L. serpens*.

### 3.2.3. Material y métodos

#### 3.2.3.1. Experimento 1: ¿Puede *P. castaneus* transportar esporas de *L. serpens*?

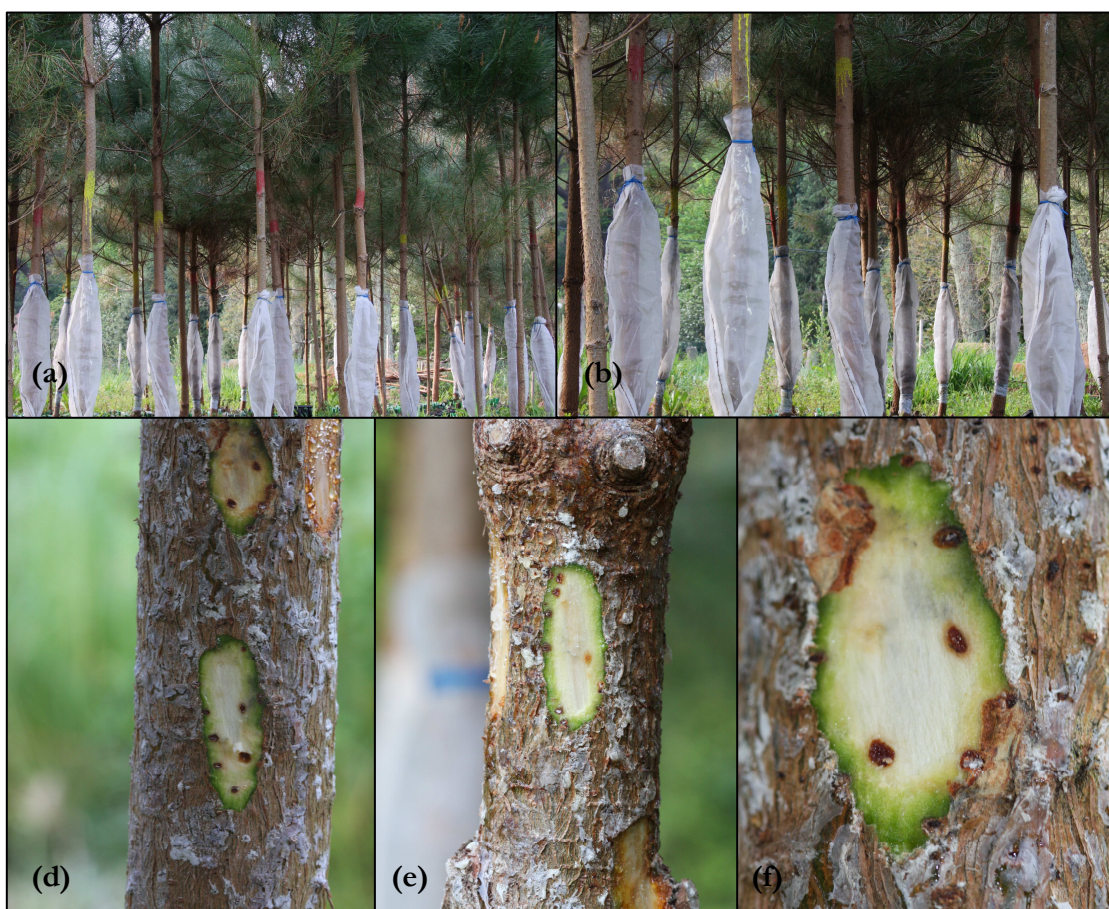
Para este experimento se utilizaron los adultos que emergieron de 20 de los árboles inoculados con *L. serpens* en el experimento anterior. Entre agosto y septiembre de 2008 se recogieron tres insectos por árbol (n=60). Para evaluar la capacidad de estos gorgojos para transportar esporas del hongo, se introdujo cada insecto en una placa con medio de cultivo MEA y el antibiótico cicloheximida (500mg/L) durante 30 minutos. Este medio de cultivo selectivo evita el crecimiento de otros tipos de hongos, lo cual favorece el crecimiento de *Leptographium*, generalmente resistente a altas dosis de cicloheximida (Jacobs & Wingfield 2001). Las placas fueron mantenidas en estufa a 22°C, en oscuridad para favorecer el crecimiento del hongo y examinadas diariamente para determinar la presencia de estructuras reproductoras (conidióforos). Para evaluar el porcentaje de adultos del gorgojo que transportan esporas de *L. serpens* en condiciones naturales, se capturaron 60 individuos de *P. castaneus* procedentes de varias zonas afectadas por el fuego, situadas en la provincia



de Pontevedra. Se introdujo cada insecto en una placa con medio de cultivo MEA y el antibiótico cicloheximida (500 mg/L) durante 30 minutos. Las placas fueron mantenidas en estufa a 22°C y en oscuridad para favorecer el crecimiento del hongo.

### 3.2.3.2. Experimento 2: ¿Puede *P. castaneus* determinar la contaminación de plantas sanas?

Para este experimento, en primer lugar se realizó la esterilización de 400 adultos de *P. castaneus* procedentes de la cría de laboratorio. Para esterilizar los insectos se rociaban con una solución de hipoclorito sódico, etanol y agua destilada (10:10:80), y después de 5 minutos se lavaban con agua destilada. A continuación, la mitad de los insectos (n=200) se contaminaron artificialmente introduciéndolos en placas de cultivo puro de *L. serpens* en MEA. Los restantes 200 insectos no contaminados se utilizaron para el grupo control. Para el test han sido utilizados 40 árboles de *P. pinaster* de 7-8 años de edad aparentemente sanos. Los árboles tratados (n=20) y los árboles control (n=20) tenían un diámetro de  $48,6 \pm 2,5$  mm y  $48,9 \pm 2,2$  mm respectivamente (Fig. 63a). El 19 noviembre de 2008, fueron



**Figura 63.** Visión general de la parcela de *P. pinaster* utilizada en este experimento (a,b). En los árboles experimentales la extracción de muestras deja al descubierto las cámaras larvarias en su fase más precoz (d-f). Todas ellas están llenas de resina, debido a la respuesta de defensa de la planta.

colocados 10 insectos por árbol (5 machos y 5 hembras), en bolsas especiales, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el anterior experimento (Fig. 63). Los insectos se mantuvieron sobre los árboles durante 2 meses, hasta el 19 enero de 2009.



**Figura 64.** Procesado de las muestras de corteza en el laboratorio. Extracción de una submuestra de corteza bajo la lupa (a-b), perforaciones realizadas por un adulto en una muestra de corteza, barra 1 mm (c), esterilización (d) y colocación de las muestras de corteza en placas de MEA con cicloheximida debajo de una campana de flujo laminar (e,f).

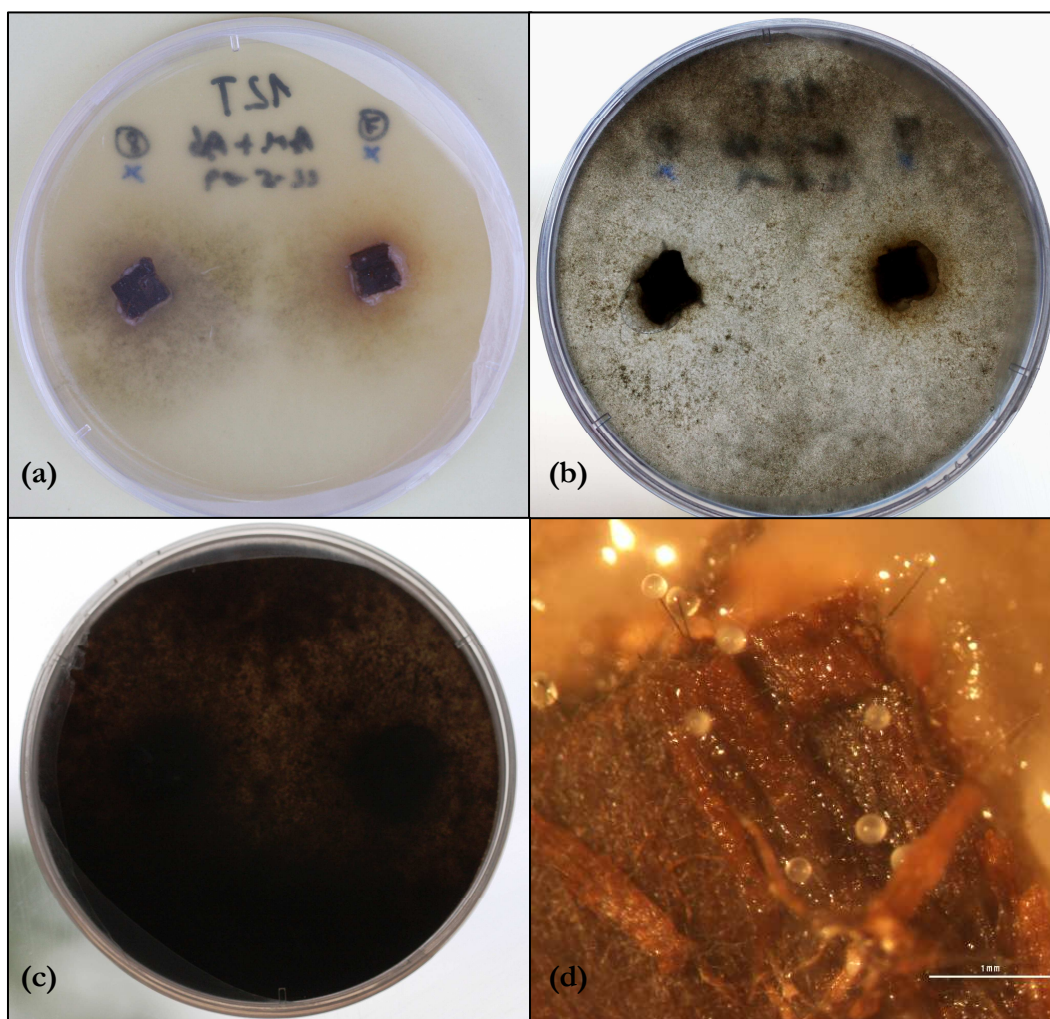
En mayo del 2009, cuatro meses después de la retirada de los insectos, se recogieron diez muestras de corteza en la porción de tronco donde se ubicaron los insectos y donde se observaban perforaciones realizadas por los curculiónidos (Fig. 63). Las muestras (n=400)

fueron esterilizadas utilizando una solución de hipoclorito sódico, etanol y agua destilada (10:10:80), colocadas en placas con MEA y cicloheximida (500 mg/L) debajo de una campana de flujo laminar (Fig. 64), e incubadas en estufa a 22°C en oscuridad.

Para analizar la relación entre la presencia de los insectos contaminados y la presencia de micelio de *L. serpens* en el tronco, se utilizó un GLM con distribución binomial y función *logit link*.

#### 3.2.4. Resultados

De las 60 placas de cultivo realizadas en total, 39 aparecieron contaminadas con *L. serpens*, es decir, el 65% de los adultos de *P. castaneus* que emergieron de los árboles inoculados llevaban *L. serpens*. En la Figura 65 se puede observar el desarrollo del micelio del hongo y los conidióforos que forma. Algunas ocasiones se observó en las placas competencia entre



**Figura 65.** Muestras de corteza en las placas de cultivo. Desarrollo después de 7 días (a), 14 días (b) y 21 días (c). Conidióforos, barra 1 mm (d).

*L. serpens* y otras especies de hongos y bacterias a pesar de la presencia de cicloheximida. Por lo tanto la falta de desarrollo del micelio de *L. serpens* podría deberse a que el insecto no lo transporta o a que otras especies de hongos hayan inhibido su crecimiento. Por otra parte, no se encontraron esporas del hongo en los 60 insectos capturados en condiciones naturales.

*L. serpens* fue aislado de 5 de los 20 árboles tratados (25%). La relación entre el tratamiento y la presencia del hongo en la corteza fue significativa (deviance ratio = 6.96, P = 0.008). El hongo no apareció en ningún árbol control. Ninguno de los árboles experimentales mostró síntomas foliares de decaimiento propios de la enfermedad fúngica.

### 3.2.5. Discusión

En este estudio se ha demostrado por primera vez que *Pissodes castaneus* podría actuar como vector de *Leptographium serpens*. Los insectos que emergen de árboles infectados por este hongo patógeno transportan esporas sobre su cuerpo y podría transmitir la enfermedad a través de las mordeduras que realizan para alimentarse o a través de los orificios que realizan para la puesta de huevos. Los resultados concuerdan con otras investigaciones donde se demostró la relación entre *P. approximatus* y *L. procerum* (Alexander et al. 1988), *P. fasciatus* y *L. wagneri* (Witcosky et al. 1986), *P. nemorensis* y *L. procerum* (Nevill & Alexander 1992) y entre *P. pini* y *L. procerum* y *L. lundbergii* (Livingston & Wingfield 1982). Sin embargo estos resultados contrastan con la ausencia de esporas en los adultos capturados en el campo, lo cuál probablemente indica que esta asociación no sea habitual en condiciones naturales.

Los curculiónidos podrían haberse contaminado con el hongo durante el desarrollo larvario en el floema, donde se propaga el micelio y/o durante la emergencia de las cámaras de pupación. La contaminación de *P. castaneus* por contacto podría ocurrir con facilidad ya que los conidios de *Leptographium* spp. se agrupan en masas mucilaginosas en los ápices de los conidióforos, y adhieren con facilidad a la superficie de los insectos para favorecer su dispersión (Jacobs & Wingfield 2001). Por otra parte, los ácaros asociados con los insectos xilófagos también podrían actuar como vectores de los hongos (Paine et al. 1997; Klepzig et al. 2001; Jacobs & Wingfield 2001). De hecho, los ácaros asociados con *Ips typographus* e *I. sexdentatus* son vectores de varias especies de hongos del género *Ophiostoma*, representando un claro ejemplo de foresia secundaria (Bridges & Moser 1986; Moser et al. 1989; Léveux et al. 1989), presente también entre *Dendroctonus frontalis* y *O. minus* (Lombardero et al 2003).

En este caso los ácaros completan un circuito de interacciones que incluyen el comensalismo (*Tarsonemus* y *Dendroctonus frontalis*), el mutualismo (*Tarsonemus* y *O. minus*), el antagonismo (*O. minus* y los hongos simbiotes) y otro mutualismo (hongos simbiotes y *Dendroctonus frontalis*).

Los árboles estudiados no mostraron síntomas aparentes de la enfermedad. Estos resultados son coherentes con otros estudios llevados a cabo con *Pinus strobus* (Wingfield 1985; Horner 1985; Nevill & Alexander 1992), y *P. taeda* (Horner 1985) en donde no se apreciaron síntomas foliares de la enfermedad hasta 12 meses después de la inoculación de *L. procerum*. Esto podría deberse a que el hongo presenta un periodo de latencia y que los síntomas foliares sólo se observan en las últimas fases de la enfermedad (Nevill & Alexander 1992).



#### 4. CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES GENERALES

---







Los resultados del estudio realizado para valorar el impacto que ejercen distintos niveles de defoliación sobre la comunidad de hongos ectomicorrícicos asociados al aparato radical de *Pinus pinaster* han permitido formular las siguientes conclusiones:

- 1) El efecto de la herbivoría sobre la comunidad fúngica depende del porcentaje de hojas eliminadas y del número de defoliaciones aplicadas.
- 2) La defoliación ligera (25%) determinó una reducción del crecimiento de los árboles hospedadores, pero no provocó ningún efecto ni sobre el porcentaje de colonización fúngica ni sobre la riqueza o diversidad de especies. Los efectos producidos en el tratamiento de defoliación ligera sobre los árboles oscilaron entre positivos y negativos, ya que por un lado aumentó el número de brotes y el número de piñas, lo cual sugiere la existencia de una respuesta compensatoria de la planta ante un estrés, y por el otro lado se redujo la altura del árbol, el diámetro del tronco y la longitud del brote terminal.
- 3) La defoliación severa (75%) afectó al crecimiento de los árboles y provocó una reducción significativa del porcentaje de colonización de ECM en las raíces, asociada a una disminución de la diversidad y de la riqueza de especies. Las plantas sometidas a este porcentaje de defoliación presentaron una reducción del número y de la longitud de los brotes, así como una reducción de la altura total y del diámetro del tronco. La defoliación severa aplicada durante 2 años consecutivos redujo del 23% la comunidad de ECM asociadas a las raíces.
- 4) La abundancia de las especies fúngicas con alta demanda de carbono se redujo al aumentar el grado de defoliación, mientras que no se detectaron diferencias en las especies fúngicas con baja demanda de carbono.
- 5) Los resultados muestran que las ECM mantienen su reproducción sexual (formación de carpóforos) a pesar de la limitación de nutrientes producida después de una defoliación del 75% de las acículas maduras aplicada durante 2 años consecutivos.
- 6) Se confirma la fuerte relación que se establece entre *P. pinaster* y las ECM, ya que cualquier situación de estrés sufrida por la planta hospedadora se refleja en la comunidad de hongos micorrícicos asociados al aparato radical.

- 7) Para estudiar la abundancia, riqueza y diversidad de una comunidad de ECM resulta importante integrar los datos cualitativos y cuantitativos relativos a las estructuras vegetativas (ápices radicales), con los datos procedentes de las estructuras reproductoras (carpóforos). De hecho, durante el estudio solo el 47% de las especies fúngicas encontradas a nivel de las raíces fueron recolectadas también como carpóforos.
- 8) La utilización de los métodos moleculares para la identificación de los hongos ectomicorrícicos en plantas de *P. pinaster* ha permitido la identificación de 5 géneros (*Meliniomyces*, *Phialophora*, *Pseudotomentella*, *Tomentella* y *Tomentellopsis*) y 11 especies (*Boletus aestivalis*, *Cortinarius alboviolaceus*, *Entoloma conferendum*, *Inocybe praetervisa*, *I. soluta*, *Pseudotomentella tristis*, *Rhizopogon verii*, *Russula drimeia*, *R. ochroleuca*, *Scleroderma verrucosum* y *Tomentella sublilacina*) nunca descritas antes en asociación con esta conífera.

Los resultados del estudio realizado sobre las interacciones ecológicas que se establecen entre *Pissodes castaneus* y el hongo patógeno *Leptographium serpens* en *Pinus pinaster* han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) La presencia del hongo fitopatógeno *L. serpens* en la misma planta colonizada por gorgojo del pino *P. castaneus* produce beneficios para el insecto, ya que gracias al desarrollo de la enfermedad fúngica la planta se debilita y el gorgojo consigue que su progenie se desarrolle con éxito. Además, incluyendo el micelio en su dieta, las larvas se desarrollan más rápidamente y en ocasiones pueden incrementar su tamaño corporal.
- 2) Independientemente de la estación, no se ha encontrado ningún indicio de competencia entre el hongo y el insecto, lo cual permite descartar de momento la existencia de una relación de antagonismo entre ambos organismos.
- 3) Se ha encontrado un incremento de la concentración de fósforo en las plantas inoculadas, especialmente durante el invierno, lo cual sugiere que el hongo determina una concentración de este nutriente. En comparación con el grupo control, el

contenido de fósforo del grupo A y B se incrementó del 46,7% y 67,6%, respectivamente. Esta circunstancia contribuyó a explicar el incremento de la progenie en primavera y verano y el tamaño de los adultos desarrollados durante el invierno. A pesar de que la relación entre los tratamientos y el contenido de nitrógeno fue significativa, la concentración de nitrógeno no se incrementó como estaba previsto en las plantas inoculadas, aunque contribuyó en parte a explicar el impacto del tratamiento sobre el tamaño corporal de los insectos durante el invierno.

- 4) Se demuestra la importancia de replicar los experimentos en diferentes épocas del año (invierno vs. primavera) y con distintas condiciones de tratamiento (colonización simultánea vs. retraso en la colonización del insecto), ya que los resultados indicaron que el impacto de *L. serpens* sobre *P. castaneus* varía según la estación y el nivel de desarrollo del micelio en la planta.
- 5) *P. castaneus* podría actuar como vector de *L. serpens* ya que sobre un total de 60 individuos que emergieron de los árboles infectados por el hongo patógeno, el 65% de ellos transportaba esporas del hongo.
- 6) Los adultos de *P. castaneus* tienen la capacidad de transmitir la enfermedad fúngica a través de las mordeduras que realizan para alimentarse o a través de los orificios que realizan para la puesta de huevos. El hongo patógeno fue aislado en el 25% de los árboles que fueron atacados por los insectos contaminados artificialmente con *L. serpens*.
- 7) Durante la cría de *P. castaneus* se obtuvieron datos interesantes sobre la biología de este insecto. Se demostró que las hembras son en promedio más largas que los machos, aunque no se observó la misma tendencia para el ancho, en donde no se detectaron diferencias significativas entre sexos. Este dato concuerda con la situación de otros miembros de la familia Curculionidae.
- 8) Se ha demostrado que un incremento de la superficie del tronco disponible para ovipositar ha determinado un aumento del número de celdas de pupación de *P. castaneus*. Por otra parte, el tamaño de estas celdas larvarias estaba significativamente y positivamente relacionado con la superficie del tronco, aunque inesperadamente tenía

una relación positiva también con el número de celdas presentes, excluyendo aparentemente la existencia de antagonismo entre las larvas por el espacio y el alimento.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Abgrall JF, Villén V, Porcile JF (2000) Biología y control del gorgojo de los pinos (II parte): desde todos los frentes. *Chile Forestal* 25:9-13

Agerer R (1987-2002) *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd

Agerer R (1991) Characterisation of ectomycorrhizas. *Methods in Microbiology* 23:25-73

Agerer R (1999) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Varma AK, Hock B (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 633-682

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* 11:107-117

Agerer R, Rambold G (2004-2009) DEEMY - An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. [www.deemy.de](http://www.deemy.de). München, Germany.

Agerer R (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5:67-107

Ágreda T, Fernández M (2003) Producción micológica en masas de *Pinus pinaster* Ait. del sudeste de la provincia de Soria. Soria, I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada.

Alauzet C (1984) *Bioecologie de *Pissodes notatus* (Coleoptera, Curculionidae)*. Tesis doctoral. University Paul Sabatier, Toulouse.

Alauzet C (1986) Développement sous-cortical d'un ravageur des pins: *Pissodes notatus* F. (Col., Curculionidae). II - Mis en évidence d'une diapause facultative. *Journal of Applied Entomology* 101:134-140

Alexander SA, Horner WE, Lewis KJ (1988) *Leptographium procerum* as a pathogen of pines. In: Harrington TC, Cobb FW (eds) *Leptographium root diseases on conifers* APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp 97-112

Alia R, Martin S (2003) EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for maritime pine (*Pinus pinaster*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Allen MF (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press, Cambridge.

Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170:47-62

Álvarez IF, Parladé J, Trappe JM, Castellano MA (1993) Hypogeous mycorrhizal fungi of Spain. *Mycotaxon* 47:201-217

Andersen CP, Rygielwicz PT (1991) Stress interactions and mycorrhizal plant response: understanding carbon allocation priorities. *Environmental Pollution* 73:217-244

Angilletta MJ, Steury TD, Sears MW (2004) Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology* 44:498-509

Arnebrant K, Ek H, Finlay R, Soderstrom B (1993) Nitrogen translocation between *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. seedlings inoculated with *Frankia* sp. and *Pinus contorta* Doug. ex Loud seedlings connected by a common ectomycorrhizal mycelium. *New Phytologist* 130:231-242

Avis PG, Dickie IA, Mueller GM (2006) A 'dirty' business: testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology* 15:873-882

Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero FJ, Vallery E (2000) Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi (Coleoptera: Scolytidae). *Ecology* 81:2198-2210

Ayres E, Heath J, Possell M, Black HIJ, Kerstiens G, Bardgett RD (2004) Tree physiological responses to above-ground herbivory directly modify below-ground processes of soil carbon and nitrogen cycling. *Ecology Letters* 7:469-479

Azevedo N (1982) Ectomicorizas del *Pinus pinaster* Sol. ex Ait. *Boletín de la Estacion Central de Ecología (ICONA)* 11:37-42

Bachiller P, Cadahía D, Ceballos G, Ceballos P, Cobos JM, Cuevas P, Dafaucé C, Dávila J, González JR, Hernández R, Ledesma L, Mallén JA, Molina J, Montoya R, Neira M, Obama E, Riesgo A, Robredo F, Romanyk N, Rupérez A, Sánchez A, Soria S, Toimil FJ, Torrent JA (1981) Plagas de insectos en las masas forestales españolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madris, España.

Barbosa P, Kirschick L, Jones E (1990) Multitrophic level interactions among microorganisms, plants and insects. Wiley, New York.

Bardgett RD, Wardle DA (2003) Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* 84:2258-2268

Barras SJ, Perry TJ (1972) Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 71:95-104

Barsali E (1922) Contribuzione allo studio del rapporti delle micorize ectotrofiche di alcune essenze arboree. *ATTI ASSOCIAZIONE Toscana Sci Nat Proc Verb* 31:16-20

Bayne H, Brown M, Bethlenfalvay G (1984) Defoliation effects on mycorrhizal colonization, nitrogen fixation and photosynthesis in the *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. *Physiologia Plantarum* 62:576-580

Bennett AE, Alers-Garcia J, Bever JD (2006) Three-Way interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants, and plant enemies: hypothesis and synthesis. *The American Naturalist* 167:141-152

Benzing DH (1980) *Biology of the Bromeliads*. Mad River Press, Eureka, California

Bethlenfalvay G, Dakessian S (1984) Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in Northern Nevada. *Journal of Range Management* 37:312-316

- Bever JD, Richardson SC (2008) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* 12:13-21
- Bichão H, Borg-Karlson AK, Araújo J, Mustaparta H (2003) Identification of plant odours activating receptor neurones in the weevil *Pissodes notatus* F. (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Comparative Physiology* 189:203-212
- Bidartondo M, Ek H, Wallander H, Söderström B (2001) Do nutrient alterations alter sink carbon sink strength of ectomycorrhizal fungi?. *New Phytologist* 151:543-550
- Bleiker KP, Six DL (2007) Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environmental Entomology* 36:1384-1396
- Bogeat-Triboulot MB, Bartoli F, Garbaye J, Marmeisse R, Tagu D (2004) Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant and Soil* 267:213-223
- Bond W, Slingsby P (1984) Collapse of an ant-plant mutualism: the Argentine ant (*Iridomyrmex humilis*) and myrmecochorous Proteaceae. *Ecology* 65:1031-1037
- Bray RL, Kurtz LT (1945) Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59:39-45
- Brazanti B, Zambonelli A (1987) Effetti della micorrizzazione sullo sviluppo di semenzali di *Pinus pinaster*. *Italian Microbiology* 2:53-57
- Breitenbach J, Kränzlin F (1981) *Champignons de Suisse*. Société de mycologie de Lucerne, Lucerne, Suisse.
- Bremner JM, Mulvaney CS (1982). Nitrogen total. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties* American Society of Agronomy, Madison, pp 595–624
- Bridges JR, Moser JC (1986) Relationship of phoretic mites (Atari: Tarsonemidae) to the bluestaining fungus, w minor, in trees infested by southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Environmental Entomology* 15:951-953
- Bright DE (1993) Systematics of bark beetles. In: Schowalter GMF (ed) *Beetle-pathogen interactions in conifer forests* Academic Press, San Diego, pp 23-36
- Bronstein JL, Barbosa P (2002) Multi-trophic/multi-species mutualistic interactions: the role of non-mutualists in shaping and mediating mutualisms. In: Tscharntke T, Hawkins B, (eds) *Multitrophic Level Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp 44-65
- Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. ACIAR Monograph, Canberra, Australia.
- Bruns TD, Shefferson RP (2004) Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: milestones and future directions. *Canadian Journal of Botany* 82:1122-1132
- Bruns TD, Arnold AE, Hughes KW (2008) Fungal networks made of humans: UNITE, FESIN, and frontiers in fungal ecology. *New Phytologist* 177:586-588

- Buchmann SL, Nabham GP (1996) The forgotten pollinators. Island Press, Washington, DC.
- Bücking H, Kuhn AJ, Schröder WH, Heyser W (2002) The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* 374:1659-1669
- Buckley WJ, Ebersole JP (1994) Symbiotic organisms increase the vulnerability of a hermit crab to predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 182:49-64
- Buée M, Courty PE, Mignot D, Garbaye J (2007) Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 39:1947-1955
- Burton AJ, Pregitzer KS, Hendrick RL (2000) Relationships between fine root dynamics and nitrogen availability in Michigan northern hardwood forests. *Oecologia* 125:389-399
- Byrd KB, Parker VT, Vogler DR, Cullings KW (2000) The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand, Yellowstone National Park, Wyoming, and Gallatin National Forest, Montana. *Canadian Journal of Botany* 78:149-156
- Caldwell AB, Jumpponen A, Trappe JM (2000) Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. *Mycologia* 92:230-232
- Calviño-Cancela M (2004) Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). *Acta Oecologica* 26:55-64
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ (2006) Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171:405-416
- Campbell WG, Bryant SA (1940) A chemical study of the bearing of decay by *Phellinus Cryptarum* Karst. and other fungi on the destruction of wood by the death-watch beetle (*Xestobium rufovillosum* Deg. *Biochemical Journal* 34:404-414
- Carle P (1967) Contribution à l'étude biologique de *Pissodes notatus* F. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée* 10-12:139-151
- Carle P (1974) Le dépérissement du pin mésogéen en Provence. *Annals of Forest Science* 31:1-26
- Casal JF, Reigosa MJ, Carballeira A (1985) Casal, JF, Reigosa MJ, Carballeira A (1985) Potential allélopathique de *Acacia dealbata* Link. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 22:1-12
- Castro M (2004) Cogomelos de Galicia e Norte de Portugal. Edicions Xerais de Galicia, Vigo
- Cervantes E, Rodríguez-Barrueco C (1992) Relationships between the mycorrhizal and actinorhizal symbioses in non-legumes. *Methods in Microbiology* 24:417-432
- Chapela HI, Osher LJ, Horton TR, Henn MR (2001) Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1733-1740
- Chen YL, Brundrett MC, Dell B (2000) Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *New Phytologist* 146:545-556



- Clay K, Marks S, Cheplick GP (1993) Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology* 74:1767-1777
- Cole FR, Madeiros AC, Loope LL, Zuehlke WW (1992) Effects of the Argentine ant on arthropod fauna of Hawaiian high-elevation shrubland. *Ecology* 73:1313-1322
- Colpaert JV, van Assche JA, Lijstens K (1992) The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* 120:127-135
- Consellería de Medio Ambiente (2008) Informe climatolóxico ano 2007. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Cordero Rivera A, Santolamazza Carbone S, Andrés JA (1999) Life cycle and biological control of the Eucalyptus snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. *Agricultural and Forest Entomology* 1:103-109
- Cullings KW, Szaro T, Bruns TD (1996) Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature* 379:63-66
- Cullings KW, Vogler DR, Parker VT, Makhija S (2001) Defoliation effects on the ectomycorrhizal community of a mixed *Pinus contorta*/*Picea engelmannii* stand in Yellowstone Park. *Oecologia* 127:533-539
- Cullings K, Raleigh C, New MH, Henson J (2005) Effects of artificial defoliation of pines on the structure and physiology of the soil fungal community of a mixed pine-spruce forest. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1996-2000
- Currie AF, Murray PJ, Gange AC (2006) Root herbivory by *Tipula paludosa* larvae increases colonization of *Agrostis capillaris* by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1994-1997
- Dabaud JC, Gay G (1987) In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* 105:429-435
- Dafni A (1984) Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15:259-278
- Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE (1997) Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in South Sweden. *Canadian Journal of Botany* 75:1323-1335
- Dahlberg A (2001) Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150:555-562
- Dajoz R (2000) Insects and forests: the role and diversity of insects in the forest environment. Lavoisier, Paris.
- Darwin C (1859) The origin of the species by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life. Murray, London.
- David A, Faye M, Rancillac M (1983) Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the in vitro formation and growth of *Pinus pinaster* roots. *Plant and Soil* 71:501-505

- De Deyn GB, Biere A, Van der Putten WH, Wagenaar R, Klironomos JN (2009) Chemical defense, mycorrhizal colonization and growth responses in *Plantago lanceolata* L. *Oecologia* 160:433-442
- De Román M, Clavería V, De Miguel AM (2005) A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycological Research* 109:1063-1104
- De Román M, De Miguel AM (2005) Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. forest over a 3 year period. *Mycorrhiza* 15:471-482
- De Viedma MG (1961) Estudio monográfico sobre el género *Pissodes* en España. *Boletín del Servicio de Plagas Forestales* 4:33-61
- De Weger LA, van der Bij AJ, Dekkers LC, Simmons M, Wijffelman CA, Lugtemberg BJJ (1995) Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonas. *FEMS Microbiology Ecology* 17:221-228
- Del Vecchio TA, Gehring CA, Cobb NS, Whitham TG (1993) Negative effects of scale insect herbivory on the ectomycorrhizae of juvenile pinyon pine. *Ecology* 74:2297-2302
- Devkota B, Schmidt GH (1990) Larval development of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. and Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) from Greece as influenced by different host plants under laboratory conditions. *Journal of Applied Entomology* 109:321-330
- Dexheimer J, Aubert-Dufresne MP, Gérard J, Le Tacon F, Mousain D (1986) Etude de la localisation ultrastructurale des activités phosphatasiques acides dans deux types d'ectomycorhizes: *Pinus nigra nigricans*/*Hebeloma crustuliniforme* et *Pinus pinaster*/*Pisolithus tinctorius*. *Bulletin de la Société Botanique de France* 133:343-352
- Diouf D, Duponnois R, Tidiane Ba A, Neyra M, Lesueur D (2005) Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional Ecology* 32:1143-1152
- Durall DM, Marshall JD, Jones MD, Crawford R, Trappe JM (1994) Morphological changes and photosynthate allocation in ageing *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quel. and *Laccaria bicolor* (Maire) Orton mycorrhizal of *Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws. *New Phytologist* 127:719-724
- Durden LA (1991) Pseudoscorpions associated with mammals in Papua New Guinea. *Biotropica* 23:204-206
- Eckhardt LG (2003) Biology and ecology of *Leptographium* species and their vectors as components of loblolly pine decline. Tesis doctoral. University of Maryland, USA.
- Eckhardt LG, Goyer RA, Klepzig KD, Jones JP (2004) Interactions of *Hylastes* species (Coleoptera: Scolytidae) with *Leptographium* species associated with loblolly pine decline. *Journal of Economic Entomology* 97:468-474
- Eckhardt LG, Weber AM, Menard RD, Jones JP, Hess NJ (2007) Insect-Fungal complex associated with loblolly pine decline in Central Alabama. *Forest Science* 53:84-92
- Egger KN (1995) Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* 73:S1415-S1422
- Ehnström B, Axelsson R (2002) Insektsnag i bark och ved. Art-Databanken, SLU, Uppsala, Sweden

- Erland S, Taylor AFS (2002) Diversity of ecto-mycorrhizal fungal community in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal ecology* Springer-Verlag, Berlin, pp 163-193
- Fernández de Ana Magán FJ (1982) Las hogueras en el monte y el ataque del hongo *Leptographium gallaeciae* sp. nv. sobre *P. pinaster* Ait. Boletín del Servicio de Plagas Forestales 8:69-92
- Fernández de Ana Magán FJ, Rodríguez A, Rodríguez Fernández RJ (1989) A influencia dos tratamentos silvícolas na micetación dos macromicetos. Congreso Luso-Galaico Macromicol. [III], 1-20. Vila Real, Portugal.
- Fernández de Ana Magán FJ, Rodríguez Fernández A (2000) Os cogumelos nos ecosistemas forestais galegos. Edicións Xerais de Galicia, Vigo.
- Fernández-Toirán LM, Ágreda T, Olano JM (2006) Stand age and sampling year effect on the fungal fruit body community in *Pinus pinaster* forest in central Spain. *Canadian Journal of Botany* 84:1249-1258
- Ferreira dos Santos N (1941) Elementos para o estudio das micorrizas ectendotróficas do *Pinus pinaster*. *Direcção-Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas* 18:65-95
- Ferreira MC, Ferreira WS (1989) Pragas das resinosas-Guia de campo. N3, Ministerio da Agricultura, Pescas e Alimentacao, Lisboa.
- Fox RTV (2000) *Armillaria root rot: biology and control of honey fungus*. Intercept Ltd., Andover, UK.
- Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T (2005) Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* 167:353-376
- Francke-Grosmann H (1967) Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects. In: Henry SM (ed) *Symbiosis volume II: associations of invertebrates, birds, ruminants, and other biota* Academic Press, New York, pp 141-205
- Fransson PMA, Andersson IC, Alexander IJ (2007) Ectomycorrhizal fungi in culture respond differently to increased carbon availability. *FEMS Microbiology Ecology* 61:246-257
- Gange AC, West HM (1994) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago lanceolata* L. *New Phytologist* 128:79-87
- Gange AC, Bower E (1997) Interactions between insects and mycorrhizal fungi. In: Gange AC, Brown VK (eds) *Multitrophic interactions in terrestrial systems* Blackwell, Oxford, United Kingdom, pp 115-132
- Gange AC, Brown VK (1997) *Multitrophic interactions in terrestrial systems: the 36th symposium of the British Ecological Society*. Blackwell Science, Oxford.
- Gange AC, Bower E, Brown VK (2002a) Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia* 131:103-112
- Gange AC, Stagg PG, Ward LK (2002b) Arbuscular mycorrhizal fungi affect phytophagous insect specialism. *Ecology Letters* 5:11-15

Gange AC (2007) Insect-mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences. In: Ohgushi T, Craig TP, Price PW (eds) Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs Cambridge University Press, London, United Kingdom, pp 124-143

García de Viedma M (1961) Estudio monográfico sobre el género *Pissodes* en España. Boletín del Servicio de Plagas Forestales 4:33-61

Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor J (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany 69:180-190

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. Molecular Ecology 2:113-118

Gardes M, Bruns TD (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. Canadian Journal of Botany 74:1572-1583

Gastreich KR (1999) Trait-mediated indirect effects of a theridiid spider on an ant-plant mutualism. Ecology 80:1066-1070

Gehring CA, Whitham TG (1991) Herbivore-driven mycorrhizal mutualism in insect susceptible pinyon pine. Nature 353:556-557

Gehring CA, Whitham TG (1994) Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. Trends in Ecology and Evolution 9:251-255

Gehring CA, Whitham TG (1995) Duration of herbivore removal and environment stress affect ectomycorrhizae of pinyon pines. Ecology 76:2118-2123

Gehring CA, Cobb NS, Whitham TG (1997) Three-way interactions among ecto-mycorrhizal mutualist, scale insects, and resistant and susceptible pinyons. The American Naturalist 149:824-841

Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P (1998) Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pine growing in two environmental extremes. Ecology 79:1562-1572

Gehring CA, Whitham TG (2002) Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) Mycorrhizal Ecology Springer-Verlag, Berlin, pp 295-320

Gehring CA, Bennett AE (2009) Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. Environmental Entomology 38:93-102

Giachini AJ, Souza LAB, Oliveira VL (2004) Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. Mycorrhiza 14:375-381

Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84:489-500

Gorissen A, Kuyper ThW (2000) Fungal species-specific responses of ectomycorrhizal Scots pine (*Pinus sylvestris*) to elevated (CO<sub>2</sub>). New Phytologist 146:163-168

Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ (1987) Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. Nature 328:420-422

- Grogan P, Baar J, Bruns TD (2000) Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology* 88:1051-1062
- Grunze N, Willmann M, Nehls U (2004) The impact of ectomycorrhiza formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytologist* 164:147-155
- Guinberteau J, Pipou N, Mamoun M, Olivier JM (1990) Ecology of various competitors from an experimental plot of *Pinus pinaster* inoculated with *Suillus granulatus* and *Lactarius deliciosus*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 28:161-165
- Gutián L (1996) Sobre el origen y la evolución de *Pinus pinaster* en Galicia. In: Rodríguez Casal A (ed) *Humanitas: estudios en homenaxe ó Prof. Dr. Carlos Alonso del Real* pp 727-742
- Haeckel E (1866) *Generelle morphologie der organismen*. Verlag Von Georg Relmer, Berlín.
- Hambleton S (2005) *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (*Hymenoscyphus ericae*), *Leotiomyces*. *Studies in Mycology* 53:1-27
- Hampp R, Wiese J, Mikolajewski S, Nehls U (1999) Biochemical and molecular aspects of C/N interaction in ectomycorrhizal plants: and update. *Plant and Soil* 215:103-113
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Harrington TC, Cobb FW (1983) Pathogenicity of *Leptographium* and *Verticicladiella* spp. isolated from roots of western North American conifers. *Phytopathology* 73:596-599
- Harrington TC (1993a) Biology and taxonomy of fungi associated with bark beetles. In: Schowalter TD, Filip GM (eds) *Beetle-pathogen interactions in conifer forest* Academic Press, London, pp 37-58
- Harrington TC (1993b) Diseases of conifers caused by *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: Wingfield MJ (ed) *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathogenicity*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, pp 161-172
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153:335-344
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN (2001) Lifehistory strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to their successional dynamics. *Mycologia* 93:1186-1194
- Hartig R (1878) *Die Zersetzungserscheinungen des holzes der nadelbäume und der eiche in forstlicher, botanischer und chemischer richtung*. Julius Springer, Berlín.
- Hartnett DC, Hetrick BA, Wilson GWT, Gibson DJ (1993) Mycorrhizal influence intra- or interspecific neighbour interactions among co-occurring prairie grasses. *Journal of Ecology* 81:787-795
- Hatcher PE (1995) Three-way interactions between plant pathogenic fungi, herbivorous insects and their host plants. *Biological Reviews* 70:639-694
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130:1213-1220

- Heard TA, Winterton SL (2000) Interactions between nutrient status and weevil herbivory in the biological control of water hyacinth. *Journal of Applied Ecology* 37:117-127
- Heim R, Font Quer P, Codina J (1934) *Fungi Iberici. Observations sur la Flore Mycologique Catalane*. Treb Mus Cienc Nat, Barcelona.
- Heinemeyer A, Hartley IP, Evans SP, Carreira de la Fuentes JA, Ineson P (2007) Forest soil CO<sub>2</sub> flux: uncovering the contribution and environmental responses of ectomycorrhizas. *Global Change Biology* 13:1786-1797
- Helmisaari HS (1992) Nutrient retranslocation within foliage of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiology* 10:45-58
- Hobbie JE, Hobbie EA (2006) <sup>15</sup>N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology* 87:816-822
- Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM, James M, van Klinken GJ (2002) Using radiocarbon to determine the mycorrhizal status of fungi. *New Phytologist* 156:129-136
- Hódar JA, Castro J, Zamora R (2003) Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming. *Biological Conservation* 110:123-129
- Hoddle MS (2004) Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conservation Biology* 18:38-49
- Hodges JD, Barros SJ, Mauldin JK (1968) Amino acids in inner bark of loblolly pine, as affected by the southern pine beetle and associated microorganism. *Canadian Journal of Botany* 47:1651-1657
- Hoeksema JD, Kummel M (2003) Ecological persistence of the plant-mycorrhizal mutualism: a hypothesis from species coexistence theory. *The American Naturalist* 162:S40-S50
- Högberg P, Högberg MN, Göttlicher SG, Betson NR, Keel SG, Metcalfe DB, Campbell C, Schindlbacher A, Hurry V, Lundmark T, Linder S, Näsholm T (2008) High temporal resolution tracing of photosynthate carbon from tree canopy to forest soil microorganisms. *New Phytologist* 177:220-228
- Horner EW (1985) Etiologic studies of *Verticicladiella procera* Kendr. in pine Christmas trees. Tesis doctoral. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Horton TS, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10:1855-1871
- Horton TR (2002) Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244:29-39
- Hsiau OTW (1996) The taxonomy and phylogeny of the mycangial fungi from *Dendroctonus brevicornis* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). Tesis doctoral. Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Hudson MA (1994) *Biological diversity: the coexistence of species*. Cambridge University Press, UK.
- Huxley CR, Cutler DF (1991) *Ant-Plant interactions*. Oxford University Press, Oxford.

- Ingham ER, Molina R (1991) Interactions among mycorrhizal fungi, rhizosphere organisms, and plants. In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG (eds) *Microbial mediation of plant-herbivore interactions* John Wiley & Sons, Inc., S. Francisco, pp 169-197
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV (1990) *Identification of ectomycorrhizas*. HMSO, London.
- Jacobs K, Wingfield MJ (2001) *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates, and agents of blue-stain. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Jakobsen I, Smith SE, Smith FA (2002) Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal ecology* Springer-Verlag, Berlin, pp 75-92
- Jentschke G, Godbold DL (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* 109:107-116
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585
- Jolivet P (1996) *Ants and plants: an example of coevolution*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Jonsson L, Dahlberg A, Nilsson M, Zackrisson O, Kären O (1999) Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests and composition following wildfire. *Molecular Ecology* 8:205-217
- Jumpponen A, Trappe JM, Cázares E (1999) Ectomycorrhizal fungi in Lyman Lake Basin: a comparison between primary and secondary successional sites. *Mycologia* 91:575-582
- Kären O, Högborg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE (1997) Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136:313-325
- Kären O, Nylund JE (1997) Effects of ammonium sulfate on the community structure and biomass of ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce stand in southwestern Sweden. *Canadian Journal of Botany* 75:1628-1642
- Karst J, Marczak L, Jones MD, Turkington R (2008) The mutualism-parasitism continuum in ectomycorrhizas: a quantitative assessment using meta-analysis. *Ecology* 89:1032-1042
- Kearns CA, Inouye D, Waser NM (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinators interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:83-112
- Kelly CD (2006) Replicating empirical research in behavioural ecology: how and why it should be done but rarely it ever is. *The Quarterly Review of Biology* 81:221-236
- Kirisits T (2004) Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C, Evans HF (eds) *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis* Springer, Netherlands, pp 181-235
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, UK.

Klepzig KD, Wilkens RT (1997) Competitive interactions among symbiotic fungi of the southern pine beetle. *Applied and Environmental Microbiology* 63:621-627

Klepzig KD, Moser JC, Lombardero FJ, Hofstetter RW, Ayres MP (2001) Symbiosis and competition: complex interactions among beetles, fungi, and mites. *Symbiosis* 30:83-96

Klepzig KD, Six DL (2004) Bark Beetle-Fungal Symbiosis: context dependency in complex associations. *Symbiosis* 37:189-205

Klironomos JN (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292-2301

Knudsen D, Peterson GA, Pratt PF (1982) Lithium, sodium, and potassium. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties* American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp 225-246

Kolb TE, Dodds KA, Clancy KM (1999) Effect of western spruce budworm defoliation on the physiology and growth of potted douglas-fir seedlings. *Forest Science* 45:280-291

Koljalg U, Dahlberg A, Taylor AFS, Larsson E, Hallenberg N, Stenlid J, Larsson KH, Fransson PM, Karen O, Jonsson L (2000) Diversity and abundance of resupinate theleporoid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forest. *Molecular Ecology* 9:1985-1996

Koljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Hoiland K, Kjoller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vralstad T, Ursing BM (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166:1063-1068

Kopper BJ, Klepzig KD, Raffa KF (2003) Effectiveness of modified White's solution removing ascomycetes associated with the bark beetle *Ips pini*. *Forest Pathology* 33:237-240

Kopper BJ, Klepzig KD, Raffa KF (2004) Components of antagonism and mutualism in *Ips pini*-fungal interactions: relationship to a life history of colonizing highly stressed and dead trees. *Population Ecology* 33:28-34

Koptur S (1992) Extraforal nectary-mediated interactions between insects and plants. In: Bernays E (ed) *Insect-Plant interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 81-129

Kosola KR, Durall DM, Robertson GP, Dickmann DI, Parry D, Russell CA, Paul EA (2004) Resilience of mycorrhizal fungi on defoliated and fertilized hybrid poplars. *Can J Botany* 82:671-680

Krushelnicky PD, Gillespie RG (2008) Compositional and functional stability of arthropod communities in the face of ant invasions. *Ecological Applications* 18:1547-1562

Kuikka K, Härma E, Markkola AM, Rautio P, Roitto M, Saikkonen K, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Tuomi J (2003) Severe defoliation of Scots Pine reduce reproductive investment by ectomycorrhizal symbionts. *Ecology* 84:2051-2061

Kula AAR, Hartnett DC, Wilson GWT (2005) Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters* 8:61-69



- Kulinich OA, Orlinskii PD (1998) Distribution of conifer beetles (Scolytidae, Curculionidae, Cerambycidae) and wood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) in European and Asian Russia. Bulletin of the European and Mediterranean Plant Protection Organisation 28:39-52
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecology and Evolution 16:248-254
- Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E (2003) Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69:327-333
- Landeweert R, Leeflang P, Smit E, Kuyper TW (2005) Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. Mycorrhiza 15:1-6
- Larena I, Salazar O, González V, Julián MC, Rubio V (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. Journal of Biotechnology 75:187-194
- Last FT, Pelham J, Mason PA, Ingleby K (1979) Influence of leaves on sporophore production by fungi forming sheathing mycorrhizas with *Betula* spp. Nature 280:168-169
- Lavallée R, Albert PJ, Kapoor NN (1993) Techniques for sexing live adults of the white pine weevil *Pissodes strobi* Peck (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Entomologist 125:745-747
- Laverty TM (1992) Plant interactions for pollinator visits: a test of the magnet species effect. Oecologia 89:502-508
- Leach JB (1940) Insect transmission of plant diseases. McGraw-Hill, New York.
- Leake J (2001) Is diversity of ectomycorrhizal fungi important for ecosystem function?. New Phytologist 152:1-8
- Leake J, Johnson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Canadian Journal of Botany 82:1016-1045
- Lennox CL, Hoffmann JH, Coutinho TA, Roques A (2009) A threat of exacerbating the spread of pitch canker precludes further consideration of a cone weevil, *Pissodes validirostris*, for biological control of invasive pines in South Africa. Biological Control 50:179-184.
- Lévieux J, Lieutier F, Moser JC, Perry TJ (1989) Transportation of phytopathogenic fungi by the bark beetle *Ips sexdentatus* Boerner and associated mites. Journal of Applied Entomology 108:1-11
- Lévieux J, Monestier C, Cassier P (1994) The fir weevil *Pissodes piceae* III. (Coleopt. Curculionidae) life cycle in Central France. A possible vector of phytopathogenic fungi. Bulletin de la Société Zoologique de France 119:4-14
- Lewis DH (1973) Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. Biological Reviews 48:261-278
- Lewis KJ, Alexander SA (1986) Insects associated with the transmission of *Verticicladiella procera*. Canadian Journal of Forest Research 16:1330-1333

- Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C, Evans HF (2004) Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Springer, The Netherlands.
- Lindner DL, Banik MT (2009) Effects of cloning and root-tip size on observations of fungal ITS sequences from *Picea glauca* roots. *Mycologia* 101:157-165
- Livingston WH, Wingfield MJ (1982) First report of *Verticicladiella procera* on pines in Minnesota. *Plant Disease* 66:260-261
- Lodge DJ (1989) The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. *Plant and Soil* 117:243-253
- Lombardero MJ (1995) Plantas huésped y escolítidos (Col: Scolytidae) en Galicia (Noroeste de la Península Ibérica). *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 21:357-370
- Lombardero MJ, Ayres MP, Hofstetter RW, Moser JC, Lepzig KD (2003). Strong indirect interactions of *Tarsonemus* mites (Acarina: Tarsonemidae) and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Oikos* 102: 243-252
- Lorenzini G, Gambogi P (1976) Un caso di moria di *Pinus pinea* associate alla presenza di *Verticicladiella* sp. *Infatore Fitopatologia* 5:5-8
- Macías F, Calvo de Anta R (2008) Mapas de solos de Galicia Escala 1:50000. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible. Xunta de Galicia.
- Mah K, Tackaberry LE, Egger KN, Massicotte HB (2001) The impacts of broadcast burning after clear-cutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* 31:224-235
- Mansilla JP (1992) Presencia sobre *Eucalyptus globulus* Labill de *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae) en Galicia. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 18:547-554
- Marcote JMC, Pose M, Traba JM (2005) Cogomelos de Galicia. Servizo de estudos e publicación da Consellería de Medio Rural.Xunta de Galicia, Santiago de Compostela.
- Markkola A, Kuikka K, Rautio P, Härmä E, Roitto M, Tuomi J (2004) Defoliation increases carbon limitation in ectomycorrhizal symbiosis of *Betula pubescens*. *Oecologia* 140:234-240
- Markkola AM (1996) Effect of artificial defoliation on biomass allocation in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 26:899-904
- Markkola AM, Ohtonen R, Tarvainen O, Ahonen-Jonnarth U (1995) Estimates of fungal biomass in Scots pine stands on an urban pollution gradient. *New Phytologist* 131:139-147
- Martín-Pinto P, Vaquerizo H, Peñalver F, Olaizola J, Oria-de-Rueda JA (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* 225:296-305
- Martínez Cortizas A, Pérez Alberti A (1999) Atlas Climático de Galicia. Consellería de Medio Ambiente, Xunta de Galicia.
- Marx DH (1980) Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: Mikola P (ed) *Tropical mycorrhiza research* Oxford University Press, New York, pp 13-71

- Marx DH, Bryan WC (1970) Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. *Canadian Journal of Botany* 48:639-643
- Massicotte HB, Molina R, Tackaberry LE, Smith JE, Amaranthus MP (1999) Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from three adjacent forest sites by five host species. *Canadian Journal of Botany* 77:1053-1073
- Mattson WJ (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:119-161
- McNaughton SJ, Wolf LL (1984) *Ecología General*. Ed Omega, Barcelona
- Mendaza Rincón R, Díaz Montoya G (1987) *Las setas: guía fotográfica y descriptiva*. Sección de micología de Iberduero, Bilbao.
- Menkis A (2004) Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycological Research* 108:965-973
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R (2005) Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33-41
- Mikola P (1965) Studies on ectendotrophic mycorrhiza of pine. *Acta Forestalia Fennica* 79:1-56
- Millard P, Hester A, Wendler R, Baillie G (2001) Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. *Functional Ecology* 15:535-543
- Ministerio Medio Ambiente (2006) *Tercer Inventario Forestal Nacional (1997-2006)*. Madrid.
- Molina R, Massicotte HB, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF (ed) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process* Routledge, Chapman and Hall, New York, USA, pp 357-423
- Molles MC (2002) *Ecology: concepts and applications*. McGraw-Hill Higher Education, Albuquerque, Nuevo México.
- Mondy N, Charrier B, Fermaud M, Pracos P, Corio-Costet M-F (1998) Mutualism between a phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*) and a vineyard pest (*Lobesia botrana*). Positive effects on insect development and oviposition behaviour. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III - Sciences de la Vie* 321:665
- Montoya R, Hernández R, Pérez V, Martín E (2002) *Procesionaria del pino*. Departamento de medio ambiente, Dirección general del medio natural, Gobierno de Aragón.
- Moore J (1984) Parasites that change the behaviour of their host. *Scientific American* 250:108-115
- Moreira X, Sampedro L, Zas R, Solla A (2008) Alterations of the resin canal system of Pinus pinaster seedlings after fertilization of a healthy and of a *Hylobius abietis* attacked stand. *Trees* 22:771-777
- Moreno G, García-Manjón JL, Zugaza A (1986) *La guía de Incafo de los hongos de la Península Ibérica*. Incafo, Madrid

- Mosca E, Montecchio L, Scattolina L, Garbaye J (2007) Enzymatic activities of three ectomycorrhizal types of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2897-2904
- Moser JC, Perry TJ, Solheim H (1989) Ascospores hyperphoretic on mites associated with *Ips typographus*. *Mycological Research* 93:513-517
- Mousain D (1971) Essai d'analyse de la symbiose ectomycorhizienne chez le Pin maritime. Tesis doctoral. University of Science and Technology, Montpellier.
- Mousain D, Couteaudier Y, Pierson J (1979) Syntheses de mycorhizes du *Lactarius deliciosus* chez le *Pinus pinaster*. *Annual of Phytopathology* 11:130
- Mousain D, Delmas J, Poitou D (1977) Influences of the ectomycorrhizae of *Hebeloma cylindrosporum* and *Pisolithus tinctorius* on the growth of young cluster pine, Proceedings of the 3rd North American Conference on Mycorrhizae. Athens, Georgia, USA.
- Moyersoen B, Alexander IJ, Fitter AH (1998a) Phosphorus nutrition of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal tree seedlings from a lowland tropical rainforest in Korup National Park, Cameroon. *Journal of Tropical Ecology* 14:47-61
- Moyersoen B, Fitter AH, Alexander IJ (1998b) Spatial distribution of ectomycorrhizas and arbuscular mycorrhizas in Korup National Park rain forest, Cameroon, in relation to edaphic parameters. *New Phytologist* 139:311-320
- Moyersoen B, Becker P, Alexander IJ (2001) Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forest. *New Phytologist* 150:591-599
- Mueller RC, Sthultz CM, Martinez T, Gehring CA, Whitham TG (2005) The relationship between stem-galling wasps and mycorrhizal colonization of *Quercus turbinella*. *Canadian Journal of Botany* 83:1349-1353
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350
- Nakamori T, Suzuki A (2007) Defensive role of cystidia against Collembola in the basidiomycetes *Russula bella* and *Strobilurus obshimae*. *Mycological Research* 111:1345-1351
- Nehls U, Hampp R (2000) Carbon allocation in ectomycorrhizas. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:95-100
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Küster H (2007) Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68:82-91
- Nevill RJ, Alexander SA (1992) Transmission of *Leptographium procerum* to eastern white pine by *Hyllobius pales* and *Pissodes nemorensis* (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Disease* 76:307-310
- Nevill RJ, Kelley WD, Hess NJ, Perry TJ (1995) Pathogenicity to loblolly pines of fungi recovered from trees attacked by southern pine beetles. *Southern Journal of Applied Forestry* 76:307-310
- Newbery DM, Alexander IJ, Rother JA (2000) Does proximity to conspecific adults influence the establishment of ectomycorrhizal trees in rain forest? *New Phytologist* 147:401-409

- Nishida T, Izumi N, Katayama N, Ohgushi T (2009) Short-term response of arbuscular mycorrhizal association to spider mite herbivory. *Population Ecology* 51:329-334
- Norris DM (1979) The mutualistic fungi of *Xyleborus* beetles. In: Batra LR (ed) *Insect-fungus symbiosis* Allanheld, Osmun & Co, Montclair, New Jersey, pp 255-289
- Nylund JE, Dahlberg A, Högberg N, Karén O, Grip K, Johnson L (1995) Methods for studying species composition of mycorrhizal fungal communities in ecological studies and environmental monitoring. In: Stocchi V, Bonfante P, Nuti M (eds) *Biotechnology of ectomycorrhizae* Plenum, New York, pp 229-239
- Olf H, Brown VK, Drent RH (1999) *Herbivores: between plants and predators*. Blackwell Science, Oxford.
- Pace ML, Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell JF (1999) Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 14:483-488
- Paine TD, Raffa KF, Harrington TC (1997) Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology* 42:179-206
- Pappinen A, Von Weissenberg K. (1994) The ability of the pine-top weevil to carry spores and infect Scots pine with *Endocronartium pini*. *European Journal of Forest Pathology* 24:258-263
- Parladé J, Pera J, Álvarez IF (1996) Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD (2008) Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58:799-810
- Pera J, Álvarez IF (1995) Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza* 5:193-200
- Pérez C, López MC, López de Silanes ME (2003) *Guía dos liques de Galicia*. Baia Edicions, A Coruña.
- Pérez-Contreras T, Soler JJ, Soler M (2008) Needle asymmetry, pine vigour and pine selection by the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa*. *Acta Oecologica* 33:213-221
- Pérez-Moreno J, Ferrera-Cerrato R (1997) Mycorrhizal interactions with plants and soil organisms in sustainable agroecosystems. In: Brussaard L, Ferrera-Cerrato R (eds) *Soil ecology in sustainable agricultural systems* CRC Lewis, Boca Raton, Florida, EEUU, pp 91-112
- Pestaña Nieto M, Santolamazza Carbone S (2009) Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. *Mycorrhiza* 19:91-98
- Peterson L, Massicotte HB, Melville LH (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC-CNRC. CABI publishing, Ottawa.
- Peyronel B, Fassi B, Fontana A, Trappe JM (1969) Terminology of mycorrhizae. *Mycologia* 61:410-411
- Picton BE, Morrow CC (2005) *Enciclopedia de marine life of Britain and Ireland*. The Ulster Museum, Belfast.

Pierce NE (1987) The evolution and biogeography of associations between lycaenid butterflies and ants. *Oxford Surveys in Ecology and Biology* 4:89-116

Pierce NE, Kitching RL, Buckley RC, Taylor MFJ, Benbow K (1987) Costs and benefits of cooperation between the Australian lycaenid butterfly, *Jalmenus evagoras* and its attendant ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 21:237-248

Pirozynski KA, Dalpe Y (1989) Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7:1-36.

Plamboeck AH, Dawson TE, Egerton-Warburton LM, North M, Bruns TD, Querejeta JI (2007) Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings. *Mycorrhiza* 17:439-447

Plassard C, Mousain D, Salsac L (1983) Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: Évaluation de la masse mycélienne et de la mycorrhization. *Canadian Journal of Botany* 22:692-699

Plassard C, Coll A, Mousain D, Salsac L (1988) Estimation quantitative de l'infection ectomycorhizienne du Pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton) en pépinière. *Acta Oecologica-Oecologia Plantarum* 9:381-391

Poitou D, Mamoun M, Delmas J (1982) Quelques résultats obtenus concernant la mycorrhization de plantes-hôtes par les champignons mycorrhiziens comestibles. In: Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (eds) *Les mycorrhizes: biologie et utilisation* Les Colloques de l'INRA, Paris, pp 295-301

Pregitzer KS (2002) Fine roots of trees - a new perspective. *New Phytologist* 154:267-273

Price PW, Bouton CE, Gross P, McPherson BA, Thompson JN, Weis AE (1980) Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:41-65

Price PW (1997) *Insect ecology*. Wiley, New York.

Querejeta JI, Egerton-Warburton LM, Allen MF (2003) Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia* 134:55-64

Raffa KF, Klepzig KD (1992) Tree defense mechanisms against insect-vectored fungi. In: Blanchette RA, Biggs AR (eds) *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 354-390

Rancillac M (1982) Multiplication végétative in vitro et synthèse mycorrhizienne: pin maritime - hebelome, pisolithe. In: Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (eds) *Les micorhizes: biologie et utilisation* INRA, Paris, pp 351-357

Rauscent L (1999) Le pin maritime en bois d'œuvre: situation et perspectives. IFN 3<sup>a</sup> Revisao, Portugal.

Rayner MC, Levisohn I (1941) The mycorrhizal habit in relation to forestry. IV. Studies on mycorrhizal response in *Pinus* and other conifers. *Forestry* 15:1-36

Read DJ, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance?. *New Phytologist* 157:475-492

- Reigosa MJ, Pedrol N, González L (2006) Allelopathy - A physiological process with ecological implications. Springer, The Netherlands.
- Renker C, Weisshuhn K, Kellner H, Buscot F (2006) Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza* 16:525-531
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M (2004) Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany* 82:1711-1729
- Richardson DM, Allsop N, D'Antonio C, Milton SJ, Rejmánek M (2000) Plant invasions: the role of mutualisms. *Biological Reviews* 75:67-75
- Robertson DR, Hoffman SG, Sheldon JM (1981) Availability of space for the territorial caribbean damselfish *Eupomacentrus planifrons*. *Ecology* 62:1162-1169
- Robertson DR (1996) Interspecific competition controls abundance and habitat use of territorial caribbean damselfishes. *Ecology* 77:885-899
- Rodríguez Soalleiro R, Álvarez Gozález JG, Cela González M, Mansilla Vázquez P, Vega Alonso P, González Rosales M, Ruíz Zorrilla P, Vega Alonso G (1997) Manual de selvicultura del *Pinus pinaster*. Escola Politécnica Superior de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Romanyk N, Cadahia D (1992) Plagas de insectos en las masas forestales españolas. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Rossow LJ, Bryant JP, Kielland K (1997) Effects of above-ground browsing by mammals on mycorrhizal infection in an early successional taiga ecosystem. *Oecologia* 110:94-98
- Rostás M, Hilker M (2002) Asymmetric plant-mediated cross-effects between a herbivorous insect and a phytopathogenic fungus. *Agricultural and Forest Entomology* 4:223-231
- Royama T (1997) Population dynamics of forest insects: are they governed by single or multiple factors? In: Watt AD, Stork NE, Hunter MD (eds) *Forest and Insects* Chapman & Hall, London, pp 37-48
- Ruehle JL, Marx DH, Aborouh M (1981) Development of *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* ectomycorrhizae on seedlings of coniferous trees important to Marocco. *Annales de la Recherche Forestière au Maroc* 21:283-296
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Saikkonen K, Ahonen-Jonnarth U, Markkola AM, Helander M, Tuomi J, Roitto M, Ranta H (1999) Defoliation and mycorrhizal symbiosis: a functional balance between carbon sources and below-ground sinks. *Ecology Letters* 2:19-26
- Sakakibara SM, Jones MD, Gillespie M, Hagerman SM, Forrest ME, Simard SW, Durall DM (2002) A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research* 106:868-878

Salzer P, Hager A (1991) Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall-bound invertase activity of their host *Picea abies*. *Botanica Acta* 104:439-445

Santolamazza-Carbone S, Rodríguez-Illamola A, Cordero Rivera A (2004) Host finding and host discrimination ability in *Anaphes nitens* Girault, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal. *Biological Control* 29:24-33

Santolamazza-Carbone S (2007) Ecología de Plagas. In: Cordero Rivera A, Barreiro Lozano R (eds) Proyecto Galicia, Ecología. Introducción a la Ecología, vol. 44. Hércules de Ediciones, A Coruña, pp 243-277

Saravesi K (2008) Mycorrhizal responses to defoliation of woody hosts. Tesis doctoral. University of Oulu, Finland.

Saravesi K, Markkola A, Rautio P, Roitto M, Tuomi J (2008) Defoliation causes parallel temporal responses in a host tree and its fungal symbionts. *Oecologia* 156:117-123

Scheromm P, Plassard C, Salsac L (1990) Nitrate nutrition of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) ectomycorrhizal with *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. *New Phytologist* 114:93-98

Schneider IA, Rudinsky JA (1969) Mycetangial glands and their seasonal changes in *Gnathotrichus retusus* and *G. sulcatus*. *Annals of the Entomological Society of America* 62:39-43

Selosse M-A, Le Tacon F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership?. *Tree* 13:15-20

Shaukat SS, Siddiqui IA, Khan GH, Zaki MJ (2002) Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed. *Plant and Soil* 245:239-247

Sheppard AW, Shaw RH, Sforza R (2006) Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe: a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption. *Weed Research* 46:93-117

Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388:579-582

Simard SW, Jones MD, Durall DM (2002) Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal ecology* Springer, Berlin, pp 733-739

Six DL (2003) Bark beetle-fungus symbioses. In: Bourtzis K, Miller TA (eds) *Insect symbiosis* CRC Press, USA, pp 97-114

Six DL, Bentz BJ (2006) Temperature determines symbiont abundance in a multipartite bark beetle-fungus ectosymbiosis. *Microbial Ecology* 54:112-118

Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* 174:847-863

Smith SE, Read D (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, UK.

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Elsevier, London, UK.



- Smith SV, Buddemeier RW (1992) Global change and coral reef ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:89-118
- Soliño AM (2004) *Macromicetos de Galicia: catálogo bibliográfico y distribución (1850-2002)*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo, Vigo.
- Solomon PS, Tan KC, Oliver RP (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi: a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology* 4 (3), 203-210. *Molecular Plant Pathology* 4:203-210
- Souto C, Pellissier F, Chiapusio G (2000) Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* 26:2015-2023
- Souto C, Bolaño JC, González L, Reigosa MJ (2001) Allelopathic effects of tree species on some soil microbial populations and herbaceous plants. *Biologia Plantarum* 44:269-275
- Stachowicz JJ, Hay ME (1999) Mutualism and coral persistence: the role of herbivore resistance to algal chemical defense. *Ecology* 80:2085-2101
- Strack D, Fester B, Hause B, Schliemann W, Walter MH (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology* 29:1955-1979
- Swaty RL, Deckert RJ, Whitham TG, Gehring CA (2004) Ectomycorrhizal abundance and community composition shifts with drought: predictions from tree rings. *Ecology* 85:1072-1084
- Takacs EA (1961) Algunas especies de hongos formadores de micorrizas en árboles forestales en la Argentina. *Revista Forestal Argentina* 5:80-82
- Talbot JM, Allison SD, Treseder KK (2008) Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* 22:955-963
- Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-111
- Taylor JH, Peterson CA (2005) Ectomycorrhizal impacts on nutrient uptake pathways in woody roots. *New Forest* 30:203-214
- Tedersoo L, Koljalg U, Hallenberg N, Larsson KH (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* 159:153-165
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjoller R (2006) Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170:581-596
- Thomas JA (1976) *The biology and conservation of the Large Blue butterfly *Maculinea arion* L.* ITE, Monks Wood, Abbots Ripton, England.
- Thomas JA (1980) Why did the large blue become extinct in Britain?. *Oryx* 15:243-247
- Tooke FGC (1955) The *Eucalyptus* snout-beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. A study of its ecology and control by biological means. *Entomology Memoirs Department of Agriculture Union of South Africa* 3:1-282
- Tourney JW, Kienholz R (1931) Trenched pots under forest canopies. *Bulletin of Yale University* 30:1-31

- Tozlu G (2001) Sarikamis (Kars) Ormanlarında Sarıçam (*Pinus sylvestris* L.)'da zarar yapan Elateridae, Buprestidae, Cerambycidae, Curculionidae (Coleoptera) ve Diprionidae (Hymenoptera) familyalarına bağlı türler üzerinde çalışmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi* 25:193-204
- Trappe JM (1962) Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *The Botanical Review* 28:538-606
- Trappe JM (1964) Mycorrhizal hosts and distribution of *Cenococcure graniforme*. *Lloydia* 27:100-106
- Trappe JM (2005) A.B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15:277-281
- Trevor E, Yu J-C, Egger KN (2001) Ectendomycorrhizal associations-characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11:167-177
- Trumble JT, Kolodny-Hirsch DM, Ting IP (1993) Plant compensation for arthropod herbivory. *Annual Review of Entomology* 38:93-119
- Tscharntke T, Hawkins BA (2002) *Multitrophic level interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Tu C, Booker FL, Watson DM, Chen X, Rufty TW, Shi W, Hu SJ (2006) Mycorrhizal mediation of plant N acquisition and residue decomposition: Impact of mineral N inputs. *Global Change Biology* 12:793-803
- Tuomi J, Kytöviita M-M, Hårdling R (2001) Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos* 92:62-70
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72
- van der Putten WH, Vet LEM, Harvey JA, Wäckers FL (2001) Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology and Evolution* 16:547-554
- Vanderklein DW, Reich PB (1999) The effect of defoliation intensity and history on photosynthesis, growth and carbon reserves of two conifers with contrasting leaf lifespans and growth habits. *New Phytologist* 144:121-132
- Vasconcelos HL (1991) Mutualism between *Maieta guianensis* Aubl., a myrmecophytic melastome, and one of its ant inhabitants: ant protection against insect herbivores. *Oecologia* 87:295-298
- Vidal JM (1991) Contribución al conocimiento de la flora micológica del Baix Empordà y zonas limítrofes (Cataluña). IV. Hongos hipogeos (Zygomycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina). *Bulletin Societat Catalana de Micologia* 14-15:143-194
- Viiri H (2004) Fungi associated with *Hyllobius abietis* and other weevils. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C, Evans HF (eds) *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe*, a Synthesis Springer, The Netherlands, pp 381-393
- Walkley A, Black IA (1934) An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37:29-37

- Wallace LL (1981) Growth, morphology and gas exchange of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Panicum coloratum* L., a C<sub>4</sub> grass species, under different clipping and fertilization regimes. *Oecologia* 49:272-278
- Wallander H, Nilsson LO, Hagerberg D, Baath E (2001) Estimation of the biomass and seasonal growth of the external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151:753-760
- Wallenda T, Stober C, Högbom H, Schinkel H, George E, Högberg P, Read DJ (2000) Nitrogen uptake processes in roots and mycorrhizas. In: Schultze E-D (ed) Carbon and nitrogen cycling in european forest ecosystems Springer, Berlin, pp 122-143
- Wamberg C, Christensen S, Jakobsen I (2003) Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia* 47:281-287
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Van der Putten WH, Wall DH (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304:1629-1633
- Wearn JA, Gange AC (2007) Above-ground herbivory causes rapid and sustained changes in mycorrhizal colonization of grasses. *Oecologia* 153:959-971
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols: A guide to methods and applications Academic press inc., USA, pp 315-322
- Whitfield J (2007) Fungal roles in soil ecology: underground networking. *Nature* 449:136-138
- Whitney H (1982) Relationships between bark beetle and symbiotic organisms. In: Mitton JB, Sturgeon KB (eds) Bark beetles in North American Conifers: A System for the Study of Evolutionary Biology University of Texas Press, Austin, pp 183-211
- Whittaker RH (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21:213-251
- Wingfield MJ, Knox-Davies PS (1980) Root-disease, associated with *Verticicladiella alacris*, of pines in South Africa. *Plant Disease* 64:569-571
- Wingfield MJ (1985) Pathogenity of *Leptographium procerum* and *L. terebrantis* on *Pinus strobus* seedlings and established trees. *European Journal of Forest Pathology* 16:299-308
- Wingfield MJ, Capretti P, MacKenzie M (1988) *Leptographium* spp.as pathogens of conifers, an international perspective. In: Harrington TC, Cobb FW (eds) *Leptographium* root diseases on conifers American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Wingfield MJ, Harrington TC, Solheim H (1995) Do conifer bark beetles require fungi to kill trees? In: Christiansen E (ed) Proceedings of the international union of forestry research organisations international symposium on bark beetle, fungus, tree interactions. As, Norway.
- Witcosky JJ, Hansen EM (1985) Root-colonising insects recovered from Douglas-fir in various stages of decline due to black-stain root disease. *Phytopathology* 75:399-402
- Witcosky JJ, Schowalter TD, Hansen EM (1986) *Hylastes nigrinus* (Coleoptera: Scolytidae), *Pissodes fasciatus*, and *Steremnius carinatus* (Coleoptera: Curculionidae) as vectors of black-stain root disease of douglas-fir. *Environmental Entomology* 15:1090-1095

Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2000) Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell and Environment* 23:39-49

Wurzburger N, Bidartondo MI, Bledsoe CS (2001) Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from conifer and pygmy forest using morphotyping and molecular methods. *Canadian Journal of Botany* 79:1211-1216

Yamada A, Katsuya K (2001) The disparity between the number of ectomycorrhizal fungi and those producing fruit bodies in a *Pinus densiora* stand. *Mycological Research* 105:957-965

Yanai RD, Fahey TJ, Miller SL (1995) Efficiency of nutrient acquisition by fine roots and mycorrhizae. In: Smith WK, Hinckley TM (eds) *Resource physiology of conifers: acquisition, allocation and utilization* Academic Press, San Diego, CA, pp 75-103

Younginger B, Barnouti J, Moon DC (2009) Interactive effects of mycorrhizal fungi, salt stress, and competition on the herbivores of *Baccharis halimifolia*. *Ecological Entomology* 34:580-587

Zipfel RD, Wilhelm de Beer Z, Jacobs K, Wingfield B, Wingfield MJ (2006) Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55:75-97

## 6. ANEXO I

Revisión bibliográfica de las publicaciones producidas desde 1922 hasta 2006 sobre los hongos ectomicorrícicos asociados a *P. pinaster*.

- **Género Amanita:**

- A. aspera* (Fr.) Gray – (Pera & Álvarez 1995)
- A. citrina* (Schaeff.) Pers. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)
- A. curtipes* J.-E. Gilbert - (Soliño 2004)
- A. gemmata* (Fr.) Bertillon in Dechambre - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda & Fernández 2003; Soliño 2004)
- A. gracilior* Bas & Honrubia - (Soliño 2004)
- A. muscaria* (L.) Hook. - (Marx 1980; Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)
- A. ovoidea* (Bull.) Link - (Soliño 2004)
- A. pantherina* (DC.) Krombh - (Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- A. phalloides* (Vaill.) Link - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)
- A. rubescens* (Pers.) Gray - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)
- A. solitaria* (Bull.) Mérat - (Soliño 2004)
- A. spissa* (Fr.) P.Kumm. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)
- A. supravolvata* Lanne - (Soliño 2004)
- A. vaginata* (Bull.) Vittad. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- A. verna* (Bull.) Vittad. - (Soliño 2004)

- **Género Amphinema**

- A. byssoides* (Pers.) J. Erikss - (Soliño 2004)

- **Género Astraeus**

- A. hygrometricus* (Pers.) Morgan - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Bankera**

- B. violascens* (Alb. & Schwein.) Pouzar- (Soliño 2004)

- **Género Boidinia**

- B. furfuracea* (Bres.) Stalpers & Hjortstam - (Soliño 2004)

- **Género Boletopsis**

- B. leucomelaena* Pers. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Boletus**

- B. aereus* Bull. - (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000; Soliño 2004)
- B. badius* Fr. - (Soliño 2004)
- B. crbisenteron* Bull. - (Soliño 2004)

- B. edulis* Bull.- (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)  
*B. erythropus* Krombh. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)  
*B. fragrans* Vittad. - (Ferreira dos Santos 1941; Trappe 1962)  
*B. personii* Bon - (Soliño 2004)  
*B. pinophilus* Pilát & Dermek - (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000)

- **Género Cantharellus**

- C. aurora* (Batsch) Kuyper. - (Soliño 2004)  
*C. cibarius* Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006)  
*C. cinereus* Pers. - (Soliño 2004)  
*C. lutescens* Fr. - (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000)  
*C. tubaeformis* Bull. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)

- **Género Cenococcum**

- C. geophilum* Fr. - (Trappe 1962; Trappe 1964; Pera & Álvarez 1995)

- **Género Chroogomphus**

- C. rutilus* (Schaeff.) O.K.Mill. - (Guinberteau et al. 1990; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Clavulina**

- C. cristata* (Holmsk.) J. Schröt.- (Soliño 2004)  
*C. rugosa* (Fr.) Schrost. - (Guinberteau et al. 1990; Soliño 2004)

- **Género Craterellus**

- C. cornucupioides* (L.) Pers - (Martín-Pinto et al. 2006)

- **Género Cortinarius**

- C. anomalus* (Fr.) Fr. - (Soliño 2004)  
*C. castaneus* (Bull.) Fr. - (Soliño 2004)  
*C. causticus* Fr. - (Fernández-Toirán et al. 2006)  
*C. cinnamomeoluteus* P.D. Orton - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)  
*C. cinnamomeus* (L.) Fr. - (Soliño 2004)  
*C. collinitus* (Sowerby) Gray - (Soliño 2004)  
*C. croceus* (Schaeff.) Höil. - (Soliño 2004)  
*C. duracinus* Fr. ((Soliño 2004)  
*C. eustriatulus* Rob.Henry - (Soliño 2004)  
*C. glaucopus* (Schaeff.) Fr. - (Pera & Álvarez 1995)  
*C. jungbunii* Fr. - (Soliño 2004)  
*C. livido-ochraceus* (Berk.) Berk. - (Soliño 2004)  
*C.malicorius* Fr. - (Soliño 2004)  
*C. mucosus* (Bull.) Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

- C. semisanguineus* (Fr.) Gillet - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- C. spadiceus* Fr. - (Fernández-Toirán et al. 2006)
- C. suillus* Fr. - (Soliño 2004)
- **Género Elaphomyces**
- E. granulatus* Fr. - (Álvarez et al. 1993; Soliño 2004)
- **Género Entoloma**
- E. hirtipes* (Schumach.) M.M. Moser - (Ágreda & Fernández 2003)
- E. mammosum* (L.) Hesler - (Ágreda & Fernández 2003)
- **Género Geastrum**
- G. nanum* Pers. - (Soliño 2004)
- G. triplex* Jungh. - (Soliño 2004)
- **Género Geopora**
- Geopora arenicola* (Lév.) Kers - (Álvarez et al. 1993)
- **Género Gomphidius**
- G. glutinosus* (Schaeff.) Fr. - (Soliño 2004)
- G. roseus* (Nees.) Fr. - (Soliño 2004)
- G. viscidus* (L.) Fr. - (Guinberteau et al. 1990)
- **Género Gyroporus**
- G. ammophilus* (M.L. Castro & L. Freire) M.L. Castro & L. Freire - (Soliño 2004)
- **Género Hebeloma**
- H. anthracophilum* Maire - (Soliño 2004)
- H. cistophilum* Maire - (Soliño 2004)
- H. crustuliniforme* (Bull.) Qué1. - (Guinberteau et al. 1990; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)
- H. cylindrosporium* Romagn. - (Mousain et al. 1977; Mousain et al. 1979; Rancillac 1982; David et al. 1983; Plassard et al. 1983; Dabaud & Gay 1987; Plassard et al. 1988; Scheromm et al. 1990; Pera & Álvarez 1995; Parladé et al. 1996; Bogeat-Triboulot et al. 2004)
- H. longicaudum* (Pers.) P.Kumm. - (Soliño 2004)
- H. mesophaeum* (Pers.) Qué1. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- H. sacchariolens* Qué1. - (Guinberteau et al. 1990)
- H. sinapizans* (Fr.) Gillet - (Brazanti & Zambonelli 1987; Pera & Álvarez 1995)
- H. subsaponaceum* P. Karst - (Pera & Álvarez 1995)
- **Género Helvella**
- H. acetabulum* (L.) Qué1. - (Soliño 2004)
- H. leucomelanea* (Pers.) Nannf. - (Soliño 2004)
- **Género Hydnangium**
- H. carneum* Wallr. - (Soliño 2004)

- **Género Hydnellum**

*H. conrescens* (Pers.) Banker - (Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006)

*H. ferrugineum* (Fr.) P.Karst. - (Soliño 2004)

- **Género Hydnum**

*Hydnum repandum* L. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)

*H. rufescens* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Hygrophorus**

*H. agathosmus* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*H. calophyllus* P.Karst. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*H. camarophyllus* (Alb. & Schwein.) Dumée, Grandjean and Maire,- (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*H. chrysodon* (Batsch) Fr. -(Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*H. gliocyclus* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*H. hypobryus* (Fr.) Fr. -(Guinberteau et al. 1990; Ágreda & Fernández 2003; Martín-Pinto et al. 2006)

*H. olivaceoalbus* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Hymenogaster**

*H. arenarius* Tul.- (Vidal 1991)

*H. hessei* Soehner,Z. - (Vidal 1991)

*H. rehsteineri* Bucholtz - (Vidal 1991)

*H. spictensis* Pat. - (Vidal 1991)

*H. thwaitesii* Berk. & Br. - (Vidal 1991)

- **Género Inocybe**

*I. agardhii* (Lund) P.D.Orton - (Soliño 2004)

*I. calamistrata* (Fr.) Gillet - (Soliño 2004)

*I. cookei* Bres. - (Soliño 2004)

*I. decipientoides* Peck. - (Guinberteau et al. 1990)

*I. dulcamara* (Alb. & Schwein.) P.Kumm. - (Soliño 2004)

*I. fastigiata* (Schaeff.) Quél - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*I. geophylla* (Sowerby) P. Kumm. - (Soliño 2004)

*I. heimii* Bon - (Soliño 2004)

*I. lacera* (Fr.) P. Kumm. - (Soliño 2004)

*I. mixtilis* (Britzelm.) Sacc. - (Soliño 2004)

*I. rimosa* (Bull.) P. Kumm. - (Soliño 2004)

- **Género Laccaria**

*L. amethystina* Cooke - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. bicolor* (Maire) P. D. Orton - (Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Bogeat-Triboulot et al. 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)



*L. laccata* (Scop.) Cooke - (Brazanti and Zambonelli 1987; Fernández de Ana Magán et al. 1989; Guinberteau et al. 1990; Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. obiensis* (Mont.) Singer - (Soliño 2004)

*L. proxima* (Boud.) Pat. - (Soliño 2004)

- **Género Lactarius**

*L. chrysorrhoeus* Fr. - (Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. deliciosus* (L.) Gray - (Barsali 1922; Trappe 1962; Mousain et al. 1979; Poitou et al. 1982; Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. fulvissimus* Romagn. - (Soliño 2004)

*L. hepaticus* Plowr. - (Guinberteau et al. 1990)

*L. piperatus* (L.) Pers. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)

*L. rufus* (Scop.) Fr. - (Pera & Álvarez 1995)

*L. sanguifluus* (Paulet) Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. scrobiculatus* (Scop.) Fr. - (Soliño 2004)

*L. subdulcis* (Pers.) Gray - (Soliño 2004)

*L. vellereus* (Fr.) Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*L. volemus* (Fr.) Fr. - (Barsali 1922; Trappe 1962)

- **Género Lyophyllum**

*L. decastes* (Fr.) Singer - (Pera & Álvarez 1995)

- **Género Melanogaster**

*M. ambiguus* (Vittad.) Tul. & C.Tul. (Parladé et al. 1996)

- **Género Otidea**

*O. bufonia* (Pers.) Boud. - (Soliño 2004)

- **Género Paxillus**

*P. involutus* (Batsch) Fr. - (Brazanti & Zambonelli 1987; Pera & Álvarez 1995; Soliño 2004)

- **Género Phellodon**

*P. niger* (Fr.) P.Karst. - (Soliño 2004)

- **Género Phlebiopsis**

*P. gigantea* (Fr.) Jülich - (Soliño 2004)

- **Género Pisolithus**

*P. arbizus* (Scop.) Rauschert - (Pera & Álvarez 1995)

*P. tinctorius* (Pers.) Coker & Couch - (Marx & Bryan 1970; Mousain et al. 1977; Ruehle et al. 1981; Azevedo 1982; Rancillac 1982; David et al. 1983; Plassard et al. 1983; Dexheimer et al. 1986)

- **Género Pseudoclitocybe**

*P. cyathiformis* (Bull.) Singer - (Ágreda & Fernández 2003)

- **Género *Rhizopogon***

*R. ellenae* A.H. Sm. - (Pera & Álvarez 1995)

*R. luteolus* Fr. & Nordholm - (Azevedo 1982; Guinberteau et al. 1990; Vidal 1991; Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. roseolus* (Corda) Th. Fr. - (Vidal 1991; Álvarez et al. 1993; Pera and Álvarez 1995; Parladé et al. 1996; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. vulgaris* (Vitt.) M. Lange - (Heim et al. 1934; Álvarez et al. 1993; Pera & Álvarez 1995)

- **Género *Rhodocollybia***

*R. maculata* (Alb. and Schwein.) Singer - (Pera & Álvarez 1995)

- **Género *Russula***

*R. acrifolia* Romagn. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. albonigra* (Krombh.) Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. alutacea* (Pers.) Fr. - (Soliño 2004)

*R. amara* Kucera - (Soliño 2004)

*R. amethystina* Quél. - (Ágreda & Fernández 2003)

*R. amoenolens* Romagn. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)

*R. atropurpurea* (Krombh.) Britzelm. - (Soliño 2004)

*R. cessans* A. Pearson - (Guinberteau et al. 1990)

*R. chloroides* (Krombh.) Bres. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. cyanoxantha* (Schaeff.) Fr. - (Marx 1980; Fernández de Ana Magán et al. 1989)

*R. delicata* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. emetica* (Schaeff.) Pers. - (Barsali 1922; Trappe 1962)

*R. foetens* (Pers.) Pers. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)

*R. fragilis* (Pers.) Fr. - (Soliño 2004)

*R. gracillima* Jul. Schöff. - (Soliño 2004)

*R. grisea* (Batsch) Fr. - (Barsali 1922; Trappe 1962)

*R. lepidicolor* Romagn. - (Soliño 2004)

*R. multicolor* J.Blum - (Soliño 2004)

*R. nigricans* (Bull.) Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. queletii* Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)

*R. rhodopoda* Zvára - (Soliño 2004)

*R. sanguinea* Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. sardonia* Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Guinberteau et al. 1990; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. torulosa* Bres. - (Guinberteau et al. 1990; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. turci* Bres. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. violacea* Quél. - (Soliño 2004)

*R. violeipes* Quél. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*R. virescens* (Schaeff) Fr. - (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández 2000)

*R. xerampelina* (Schaeff.) Fr. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Sarcodon**

*S. glaucopus* Maas Geest. & Nannf. - (Soliño 2004)

*S. imbricatus* (L.) P. Karst. - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*S. scabrosus* (Fr.) P. Karst. - (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

- **Género Scleroderma**

*S. bovista* Fr. - (Soliño 2004)

*S. cepa* Pers. - (Soliño 2004)

*S. citrinum* Pers. - (Takacs 1961; Trappe 1962; Trappe 1964; Azevedo 1982; Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Parladé et al. 1996; Soliño 2004)

*S. polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers. - (Soliño 2004)

- **Género Stropharia**

*S. aeruginosa* (Curtis.) Quél - (Ágreda & Fernández 2003)

- **Género Suillus**

*S. bellini* (Inzenga) Watling - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)

*S. bovinus* (Pers.) Roussel - (Barsali 1922; Rayner & Levisohn 1941; Trappe 1962; Trappe 1964; Mousain 1971; Plassard et al. 1988; Fernández de Ana Magán et al. 1989; Pera & Álvarez 1995; Ágreda & Fernández 2003; Soliño 2004)

*S. collinitus* (Fr.) Kuntze - (Pera & Álvarez 1995)

*S. granulatus* (L.) Kuntze - (Barsali 1922; Costantini 1923; Heim 1957; Takacs 1961; Marx 1980; Poitou et al. 1982; Brazanti and Zambonelli 1987; Pera and Álvarez 1995; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*S. luteus* (L.) Gray - (Poitou et al. 1982; Pera and Álvarez 1995; Fernández de Ana Magán and Rodríguez Fernández 2000; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)

*S. variegatus* (Sw.) Kuntze. - (Pera & Álvarez 1995)

- **Género Thelephora**

*T. terrestris* Ehrh. - (Marx & Bryan 1970; Marx 1980; Rühle et al. 1981; Guinberteau et al. 1990; Pera & Álvarez 1995; Bogeat-Triboulot et al. 2004; Soliño 2004)

- **Género Tricholoma**

*T. acerbum* (Bull.) Vent. - (Soliño 2004)

*T. albobrunneum* (Pers.) P. Kumm.- (Ágreda and Fernández 2003; Fernández-Toirán et al. 2006)

*T. batschii* Gulden - (Ágreda & Fernández 2003)

*T. colossus* (Fr.) Qué1. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004)

- T. equestre* (L.) P. Kumm. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)
- T. flavovirens* (Pers.) S. Lundell - (Poitou et al. 1982; Fernández de Ana Magán et al. 1989)
- T. focale* (Fr.) Ricken - (Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- T. fracticum* (Britzelm.) Kreisel - (Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)
- T. fucatum* (Fr.) P.Kumm. - (Soliño 2004)
- T. joachimii* Bon and A. Riva - (Soliño 2004)
- T. malvium* (Battarra) Fr. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)
- T. pessundatum* (Fr.) Qué1. - (Guinberteau et al. 1990; Soliño 2004)
- T. portentosum* (Fr.) Qué1. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Soliño 2004; Martín-Pinto et al. 2006)
- T. saponaceum* (Fr.) P. Kumm. - (Fernández de Ana Magán et al. 1989; Ágreda and Fernández 2003; Soliño 2004; Fernández-Toirán et al. 2006)
- T. sejunctum* (Sowerby) Qué1. - (Soliño 2004)
- T. sudum* (Fr.) Qué1. - (Soliño 2004)
- T. terreum* (Schaeff.) P. Kumm. - (Marx 1980; Ágreda and Fernández 2003; Martín-Pinto et al. 2006; Fernández-Toirán et al. 2006)
- T. ustaloides* Romagn. - (Soliño 2004)
- **Género Tuber**
- Tuber aestivum* Vittad. - (Vidal 1991)
- T. borchiü* Vittad. - (Vidal 1991)
- **Género Tylopilus**
- T. felleus* (Bull.) P. Karst. - (Soliño 2004)
- **Género Xerocomus**
- X. badius* (Fr.) Kühner - (Fernández de Ana Magán et al. 1989)
- X. chrysenteron* Bull. - (Pera & Álvarez 1995)