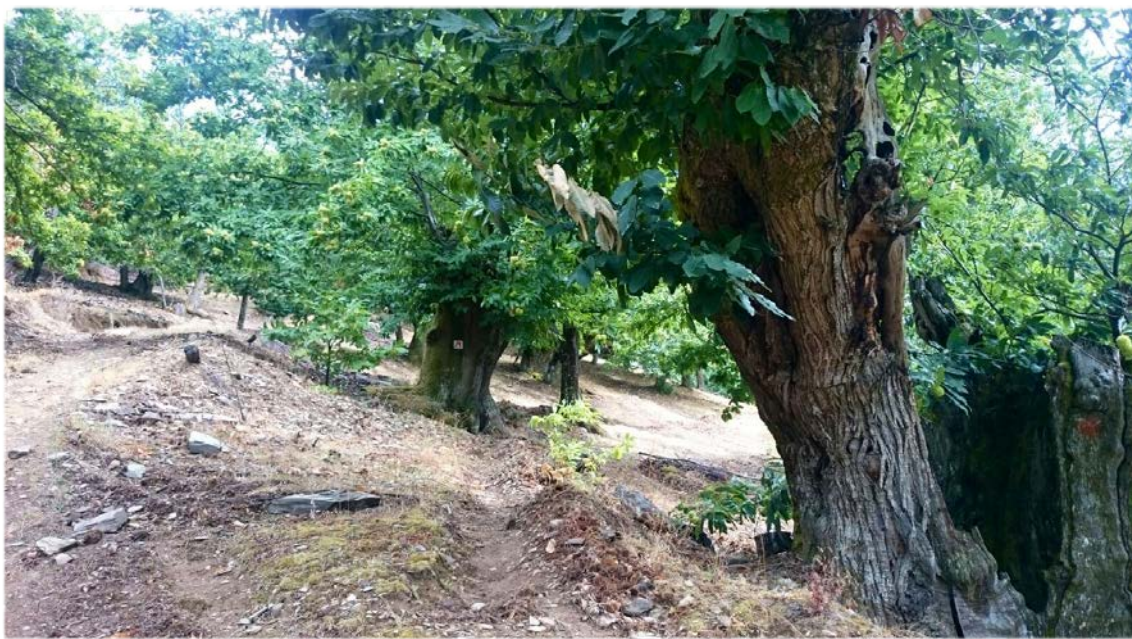




Estudio y caracterización de las micorrizas asociadas a *Castanea sativa* Mill. Obtención en vivero de planta inoculada de calidad con vistas a su utilización en reforestación y recuperación de zonas degradadas



Memoria presentada por la Licenciada Amaya Álvarez Lafuente para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de León

Noviembre 2015

Director de Tesis
Arsenio Terrón Alfonso
(Universidad de León)

Codirector de Tesis:
Anabela M. de Rodríguez Azul
(Universidad de Coimbra)

Agradecimientos

Agradezco a todos los organismos la financiación de este trabajo. A la Junta de Castilla y León la concesión de la beca de formación de personal investigador. A la Universidad de León la Ayuda a grupos de investigación. A Juan Luis Peñuelas Rubira director de CNRGF “El Serranillo” donde se realizaron los trabajos de micorrización en vivero durante el contrato de asistencia técnica con el MAGRAMA.

A mi director de tesis Arsenio Terrón Alfonso por plantearme el estudio de las micorrizas de los castaños y con eso abrirme este interesante y sobre todo práctico mundo. A mi directora Anabela Marisa de Rodríguez Azul por enseñarme el espectacular mundo de las ectomicorrizas a través de una lupa y un microscopio, pero sobre todo por el ánimo durante los meses tan extenuantes en el laboratorio de Coimbra y la cantidad de nuevas ideas aportadas. A Carmen Acedo Casado por ayudarme a obtener la beca de la Junta de Castilla y León. Mirem K. Duñabeitia por intentar hacer un trabajo conjunto y enseñarme el mundo viverístico junto con Kepa.

A Beatriz Cuenca y Luis Ocaña por la producción de clones en el vivero de TRAGSA de Maceda. A Basilio Llamas por la ayuda con la determinación de los grupos conflictivos de hongos y la realización de sus fotografías. A Fernanda Azul por el intenso trabajo y ayuda de limpieza de las muestras de campo. A Paz Andrés del Departamento de Ingeniería y Gestión Forestal y Ambiental (UPM) por la realización de las analíticas de calcio y hierro. A Alberto García por las fotos de *Craterellus cornucopioides* y *Butyriboletus regius*.

A Luis Fernando Benito Matías el mejor compañero de trabajo que he tenido, grande por tus conocimientos pero mucho más grande por tu actitud. Gracias por enseñarme a cultivar una buena planta y lo poquito de fisiología que estoy consiguiendo aprender de tí. A Pedro Villar por sus revisiones en los capítulos de micorrización y su ánimo. A Luis Gonzaga por todas las ideas aportadas pero sobre todo por el ánimo para seguir con el trabajo.

A Laura M. Suz sin tí no existirían las micorrizas en esta tesis, espero seguir trabajando mucho tiempo contigo. A Juan Galallardo por la realización de los perfiles edáficos, pero sobre todo por seguir todos este tiempo a la espera de resultados desde cualquier país en el que se encontrara.

A mis amigos y compañeros de departamento Sara del Río y Ángel Penas, sin vosotros esta tesis no hubiera llegado a su fin, el apoyo y la ayuda ha sido incondicional e imposible de agradecer en dos líneas. Pedro Sastre, cuánto cariño te tengo y cuánto me abriste los ojos en el manejo de laboratorio y su equipamiento. Linda un gran corazón que compartir. Antonio Laborda tu apoyo ha sido muy importante para seguir con el trabajo y llegar a escribir este texto.

A mis dos seteros favoritos sin los que una parte no presentada en esta memoria, pero muy importante no hubiera podido realizarse. Anabel Antelo y Yuma gracias por vuestra confianza y amistad.

A mis amigos de siempre (ya siempre porque esta tesis comenzó hace 14 años) Gemi, Mada, Javi, Camino, Jorge, Javi...sin palabras porque durante mucho tiempo mi vida se anuló con la tesis y hasta el día de esta firma habéis seguido ahí esperándome. Os debo mucho tiempo.

A mi familia mis padres Juan Ramón y Maribel, lo que habéis sufrido, y mis hermanos, Juan y Adrián, las charlas que os he dado, gracias a los cuatro por apoyarme en todo. Y cómo no a mi nueva familia. Luis, creo que hemos hecho las mejores micorrizas posibles: Iraya y Yeray. Y Luis no hay palabras para decirte GRACIAS.

En el último párrafo pero en un lugar muy importante de mi corazón quiero dedicar esta tesis a Mario Honrubia amigo y compañero de trabajo sin el cual no hubiera llegado a realizar el depósito de la memoria, seguro. Gracias a tí Mario, eternamente. Siento que no estés hoy aquí.

Resumen

El castaño europeo, *Castanea sativa* Mill., es una especie forestal de gran importancia económica y paisajística en muchos Países mediterráneos. En las últimas décadas, el cultivo de esta especie ha disminuido dramáticamente en muchas regiones debido los profundos cambios sociales en las áreas rurales y al ataque de patógenos. Los ecosistemas de *C. sativa* se encuentran entre las prioridades de conservación en Europa (Directiva Hábitat 92/43 / CEE, 1993) y representan una fuente importante de ingresos, por su fruto, su madera y más recientemente la recolección de hongos comestibles. Parte de estos hongos son ectomicorrícicos asociados simbióticamente a las raíces de las plantas favoreciendo su nutrición y estado fisiológico. La producción de plantas micorrizadas para su uso en plantaciones de repoblación o productoras de hongos comestibles es ya una práctica. Paradójicamente la diversidad micológica y la micorrización en vivero de *C. sativa* está hasta el momento muy poco estudiada, sobre todo en lo que concierne a la zona comunidad de El Bierzo.

Como punto de partida para abrir una línea de micorrización de *C. sativa* en vivero se caracterizó la comunidad ectomicorrícica asociada de forma natural para valorar y obtener una fuente de inóculo con la que trabajar. Los hongos micorrícicos con especial importancia económica encontrados en El Bierzo (grupo *Boletus*, *Amanita caesarea*, *Cantharellus cibarius*, entre otros) resultaron ser de muy difícil manejo en vivero, resultando fallidos varios ensayo en años consecutivos. Por ello se realizaron trabajos de micorrización en vivero con diferentes especies de género *Tuber*. El género *Tuber* (trufas) incluye diversas especies ectomicorrícicas de elevado valor económico y fáciles de manejar en vivero para la producción de planta micorrizada destinada a plantaciones de producción micológica. *C. sativa* es una especie descrita como calcífuga y *Tuber* spp. requiere de un contenido mínimo de carbonato cálcico en suelo por lo que se centró el desarrollo de este trabajo en la obtención de planta de calidad micorrizada de *C. sativa* con *Tuber* spp. Se utilizaron plántulas obtenidas a partir de semilla y clones híbridos de *C. sativa* x *C. crenata* por su resistencia a patógenos de raíz. Se realizaron diferentes combinaciones planta-hongo y salvo para una única especie de trufa la micorrización en vivero fue exitosa. Se analizaron parámetros morfológicas, fisiológicas y nutricionales de las plantas para asegurar que *C. sativa* no resultaba dañado ni mermaba su calidad de planta de repoblación forestal en condiciones de elevado contenido de calcio en el sustrato. Este trabajo ha conseguido producir planta micorrizada de calidad de *C. sativa* con *Tuber* spp., punto de partida para comenzar el establecimiento de plantaciones en campo que puedan resultar productoras de trufas generar adoras de rentas en este ecosistema agrosilvopastoral.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1. El castaño europeo: <i>Castanea sativa</i> Mill.	3
1.1. <i>Castanea sativa</i> Mill.	3
1.2. <i>Castanea sativa</i> Mill. en España	5
1.3. <i>Castanea sativa</i> Mill. en la comarca del Bierzo	5
2. Micorrizas y hongos ectomicorrícicos	7
2.1. Valoración de la biodiversidad de hongos ectomicorrícicos	9
2.2. Un valor añadido a las ectomicorrizas: los hongos ectomicorrícicos comestibles	10
2.3. Posible manejo de los hongos ectomicorrícicos comestibles: Micorrización	13
Objetivos	15

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES ECTOMICORRÍICAS DE LOS CASTAÑARES DEL BIERZO

Capítulo 1: Área de estudio	19
1.1. Localización	19
1.2. Bioclimatología y Biogeografía	21
1.3. La vegetación en el área de estudio	23
1.4. Usos y suelos de las parcelas estudiadas de <i>Castanea sativa</i> Mill.	25
Capítulo 2: Inventario de macromicetes epigeos en masas de <i>Castanea sativa</i> Mill. en el Bierzo	41
2.1. Introducción	41
2.2. Material y métodos	42
2.3. Resultados	43
2.4. Discusión	60
Capítulo 3: Caracterización de las comunidades ectomicorrícicas de <i>Castanea sativa</i> Mill. en el Bierzo	61
3.1. Introducción	61
3.2. Material y métodos	62
3.2.1. Muestreo de raíces	62
3.2.2. Evaluación del estado de colonización fúngica de las raíces	63
3.2.3. Caracterización de morfotipos	63
3.2.4. Análisis molecular de las micorrizas	63

3.3. Resultados	64
3.4. Discusión	76

OBTENCIÓN EN VIVERO DE PLANTA DE *CASTANEA SATIVA* Mill. MICORRIZADA CON *TUBER* spp.

Capítulo 4: Micorrización de <i>Castanea sativa</i> Mill. con <i>Tuber aestivum</i> Vittad., <i>T. brumale</i> Vittad., <i>T. macrosporum</i> Vittad. y <i>T. uncinatum</i> Chatin	81
4.1. Introducción	81
4.2. Material y métodos	83
4.2.1. Producción de plántulas.....	83
4.2.2. Producción de inóculo. Inoculación	83
4.2.3. Cultivo en invernadero	83
4.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorrización	84
4.2.5. Análisis estadístico	85
4.3. Resultados	86
4.3.1. Micorrizas y grado de micorrización	86
4.3.2. Efecto de la micorrización de <i>Tuber</i> sp. sobre parámetros morfológicos y fisiológicos	90
4.4. Discusión	93
Capítulo 5: Efecto de la micorrización con <i>Tuber</i> spp. en el desarrollo de clones híbridos de castaño	97
5.1. Introducción	97
5.2. Material y métodos	100
5.2.1. Producción de los clones	100
5.2.2. Producción de inóculo. Inoculación	100
5.2.3. Cultivo en invernadero	100
5.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorrización	102
5.2.5. Análisis estadístico	103
5.3. Resultados	103
5.3.1. Micorrizas y grado de micorrización	103
5.3.2. Efecto de la micorrización de <i>Tuber</i> sp. sobre parámetros morfológicos y fisiológicos	107
5.4. Discusión	113
Capítulo 6: Micorrización de <i>Castanea sativa</i> Mill. con <i>Tuber melanosporum</i> Vittad	117
6.1. Introducción	117

6.2. Material y métodos	118
6.2.1. Producción de plántulas	118
6.2.2. Producción de inóculo. Inoculación	119
6.2.3. Cultivo en invernadero	119
6.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorización	120
6.2.5. Análisis estadístico	121
6.3. Resultados	121
6.3.1. Micorrizas y grado de micorización	121
6.3.2. Efecto de la micorización de <i>Tuber</i> sp. sobre parámetros morfológicos y fisiológicos	123
6.4. Discusión	127

CONCLUSIONES	133
---------------------------	-----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
---	-----



INTRODUCCIÓN GENERAL

OBJETIVOS

Introducción

1. El castaño europeo: *Castanea sativa* Mill.

1.1. *Castanea sativa* Mill.

Castanea sativa Mill. es la única especie del género *Castanea* en Europa ocupa una superficie de 2,5 millones de hectáreas en 15 países de la Europa central y Mediterránea (Bourgeois et al. 2004; Conedera et al. 2004; Konstantinidis et al. 2008). Se extiende desde el Cáucaso a Italia, Francia, España, Portugal y el sur Inglaterra. Esta distribución de amplio rango a lo largo el sur de Europa pone de manifiesto la capacidad de adaptación de la especie a diferentes condiciones ambientales (Lauteri et al. 1998; Martín et al. 2010)

El origen biogeográfico del género *Castanea* se sitúa en Asia, en el período Terciario desde donde se extiende progresivamente hacia el oeste originando como resultado *C. sativa* Mill. (castaño europeo) y, hacia el este, dando lugar a *C. dentata* (Marsch.) Borkh (castaño americano) (Zohary y Hopf 1988).

Estudios polínicos indican que *C. sativa* sobrevivió probablemente a los períodos fríos de la última glaciación en Europa en seis áreas: al sur del Mar Negro, en el sur y el centro de Italia, en el noreste de Italia, en partes del norte de la Península Ibérica, en el sur de Grecia y en el noroeste de parte de Siria.

Con los griegos y los romanos el castaño y su cultivo se ha extendido a Europa central y del sur, por lo que hoy en día es difícil de rastrear de forma precisa su origen y autoecología (Conedera y Krebs 2008).

La distribución actual de *C. sativa* está fuertemente influenciada por las actividades humanas, especialmente desde la época medieval cuando comienzan a seleccionarse variedades para producción de frutos de mejor calidad en los sotos (Zoller 1960; Zohary y Hopf 1988; Conedera et al. 2004; Krebs et al. 2004).

Los bosques de *C. sativa* han sido reconocidos como hábitats de interés en la red europea Natura 2000 y se consideran paisajes característicos culturales de las regiones del Mediterráneo y del Atlántico (Díaz Varela et al. 2009).

1.2. *Castanea sativa* Mill. en España

El origen de las poblaciones ibéricas es todavía incierto. Los registros de polen fósil sugieren que los *pools* genéticos del Norte de España y sur de Galicia se originaron durante el último máximo glacial desde poblaciones ubicadas en dos refugios: uno situado en la costa cantábrica,

desde los Picos de Europa en Asturias a la región Vasco-Francesa, y el otro en el norte de Portugal y Galicia (Krebs et al. 2004).

Actualmente en España se calcula que la superficie que ocupa *C. sativa* es de 272.400 hectáreas, siendo especie dominante en 154.500 hectáreas (castaño tasa de cobertura de árboles, CTR C 60%) (DGN 1997-2006; Menéndez-Miguélez et al. 2015). La distribución del castaño en España es discontinua, con las áreas más grandes ubicadas en el norte –Asturias, Galicia, Navarra, Cataluña– y rodales dispersos en el centro y sur, Andalucía (Martín et al. 2012). Se encuentra desde el nivel del mar hasta 1.800 m de altitud y su necesidad ómbrica anual es muy variable entre 500 y 1.000 mm (Rivas-Martínez 1987). Ocupa tres subregiones climáticas –Atlántica, Centroeuropea y Mediterránea– (Figura 1), y la principal limitación del castaño es el tipo de suelo, ya que no puede soportar altos niveles de calcio activo (Allué 1990).



Figura 1. Mapa de masas forestales con especie dominante *Castanea sativa* Mill. (castañares). Fuente: Mapa Forestal de España (DGNC 1997-2006).

Tanto la producción de fruto como de madera de los castañares españoles se ha visto muy mermada por la extensión de plagas producidas principalmente por chancro (*Cryphonectria parasitica* (Murr.)), tinta (*Phytophthora cambivora* (Petri) Buissman y *P. cinnamomi* Rands.) y desde hace unos años por la avispa del castaño (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu). Frente al chancro se han realizado programas de hibridación de especies de *Castanea* y de hipovirulencia

pudiendo ser estas líneas de actuación las que logren proporcionar una solución a la enfermedad. Con respecto a la tinta se han realizado hibridaciones de *C. sativa* con especies asiáticas –*C. crenata* Blume y *C. mollissima* Sieb. et Zucc.– (Gallastegui 1926; Urquijo 1944) y ensayos de control utilizando hongos ectomicorrícicos (Branzanti et al. 1994; Branzanti et al. 1999).

1.3. *Castanea sativa* Mill. en la comarca del Bierzo

La comarca del Bierzo (noroeste de la provincia de León) forma una hoya tectónica rodeada por montañas, dando lugar a una morfología homogénea de valles fluviales fuertemente encajados con grandes diferencias de altitud, desde los 2.000 m en las sierras a los 500 m en la depresión central. Las condiciones climáticas y su geología (fundamentalmente cuarcitas y pizarras) que forman suelos ácidos con poca cantidad de calcio de cambio, son óptimas para el desarrollo de *C. sativa*.

En los últimos cincuenta años, la comarca del Bierzo ha registrado una tendencia regresiva de los sotos de castaño (Figura 2), debido al abandono de las masas productoras, problemas fitosanitarios y los incendios forestales (Fernández-Manso y Robles Llamazares 2009).

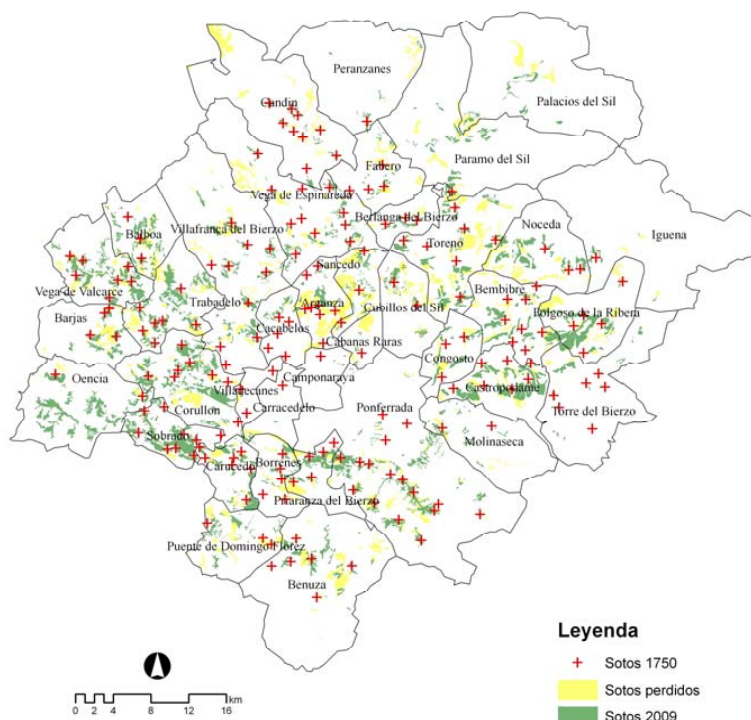


Figura 2. Regresión de los sotos de castaño en el Bierzo en los últimos 50 años. Fuente: Fernández-Manso y Robles Llamazares (2009).

La superficie ocupada por el castaño en la provincia de León, según el Tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3) (1997-2006), es aproximadamente 36.000 hectáreas (Figura 3), la mayoría en el Bierzo, con una producción media de castaña estimada de a 8.000 toneladas (Rubio et al. 2013).

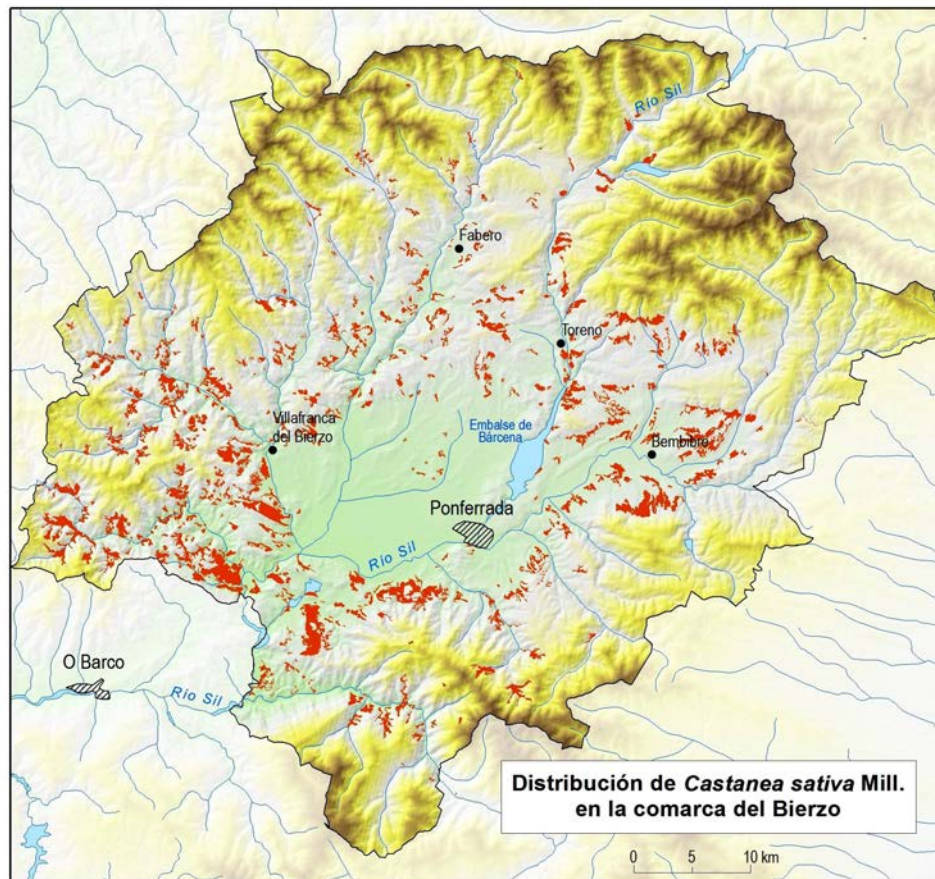


Figura 3. Distribución de *Castanea sativa* Mill. en la comarca del Bierzo.

Aunque la tendencia actual de su aprovechamiento en el Bierzo es regresiva, siguen siendo una importante expresión territorial, con reflejo en el paisaje, en los sistemas ecológicos y socioeconómicos en la comarca (Fernández-Manso y Robles Llamazares 2009).

Las condiciones climáticas y de suelo existentes en el Bierzo son idóneas para el cultivo del castaño, siendo estos dos factores determinantes para que las castañas de la comarca sean de buena calidad y hayan obtenido el sello “Marca de Garantía Castaña del Bierzo” desde el año 2005.

En esta zona el castaño está adaptado a diferentes condiciones de orografía, altitud, clima y tipos de suelo lo que da lugar a sotos de castaños con dimensiones muy variadas, al mismo tiempo que aparecen masas de castaño de monte bajo.

2. Micorrizas y hongos ectomicorrícicos

El término micorriza (Mycorrhiza: hongo-raíz) fue propuesto por Frank (1885), para definir asociaciones simbióticas, mutualistas, no patógenas entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados. Actualmente, el concepto de “micorriza” se considera en un sentido más amplio, para dar cabida a aquellas asociaciones simbióticas hongo-planta que se establecen en raíces y otros órganos de contacto, especializados para el intercambio de nutrientes y que abarca un continuum de estrategia trófica del hongo desde mutualismo hasta parasitismo (Egger y Hibbett 2004; Smith y Read 2008; Honrubia 2009).

La estructura y función de los distintos tipos de micorrizas está íntimamente relacionada con su distribución en los principales biomas terrestres. En los bosques mediterráneos abundan cuatro tipos diferentes morfológica y funcionalmente: endomicorrizas, ectomicorrizas, micorrizas arbutoides y micorrizas ericoides (Smith y Read 2008). El castaño forma ectomicorrizas (ECM) que se caracterizan por la presencia del manto y una red de hifas que se distribuye por la zona cortical de la raíz –red de Hartig– (Figura 4).



Figura 4. Características de las ectomicorrizas: **a)** Morfología externa; **b)** vista general al microscopio; **c)** manto externo; **d)** red de Hartig.

Las ectomicorrizas (ECM) están formadas por miembros de los phyla Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota. Se estiman 6.000 plantas (aproximadamente) y entre 20.000-25.000 especies de hongos implicados en la formación de ectomicorrizas en todo el mundo (Rinaldi et al. 2008; Tedersoo et al. 2010).

Aunque la proporción de especies fúngicas implicadas (0,5-0,7%; Hawksworth 2001) y de especies vasculares (aproximadamente 2%; Scotland and Wortley 2003, Brundett 2009) es pequeña, estas simbiosis se establecen en las comunidades boscosas y forestales de mayor importancia económica y ecológica en los diferentes hábitats del mundo (Tedersoo et al. 2010).

En los ecosistemas forestales de las zonas de clima boreales, templados y mediterráneos los hongos ectomicorrícicos (ectomycorrhizal mushrooms; ECMM) se encuentran asociados con árboles pertenecientes a las familias *Pinaceae*, *Abietaceae*, *Fagaceae*, *Tiliaceae*, *Betulaceae* y *Myrtaceae* (Courtney et al. 2010).

Los ECMM interactúan en su medios abiótico y biótico, constituyendo la micorrizosfera un espacio complejo de acción biológica con impacto en los ciclos de nutrientes y ecología de las plantas, tanto en ecosistemas naturales como en aquellos antropizados (Finlay 2005) (Figura 5).

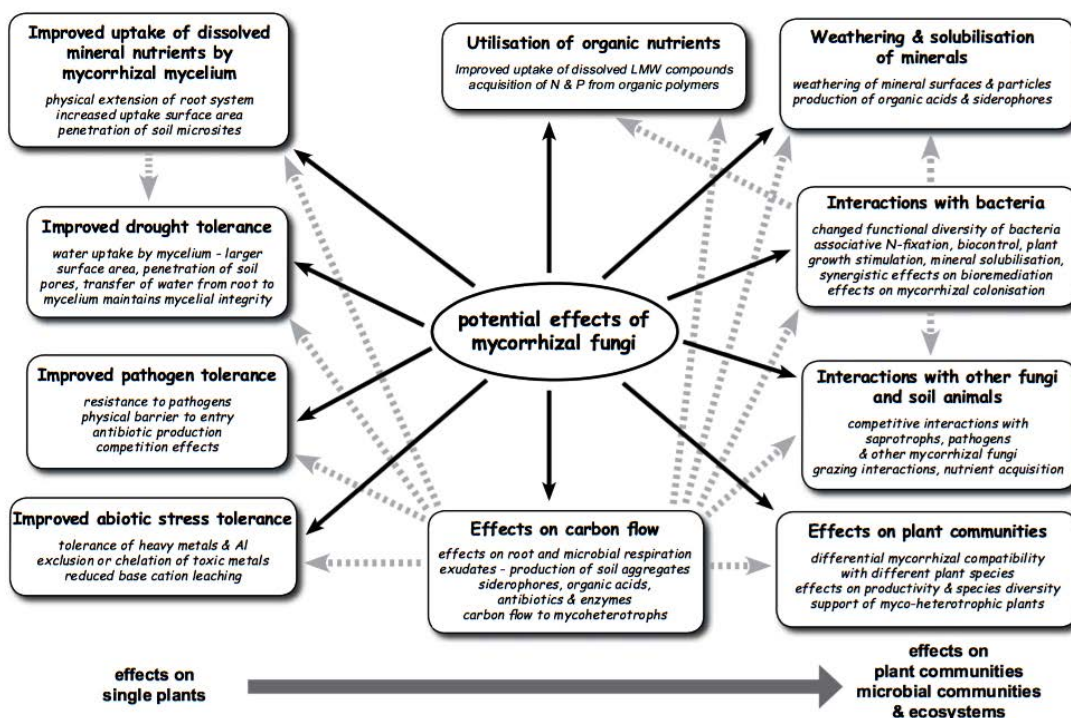


Figura 5. Diagrama de interacciones de los hongos micorrícicos en la adquisición de nutrientes y ecología de las comunidades vegetales. Fuente: Finlay 2005.

En cuanto a nutrientes hay un efecto cuantitativo de los ECMM sobre la absorción de nutrientes y agua, un efecto cualitativo como suministro de compuestos poco disponibles para raíces no micorrizadas (N orgánico y compuestos de P) y, es probable, que algunos hongos ectomicorrícicos tengan capacidad de liberar nutrientes por meteorización de los minerales. Además desempeñan un papel importante en la disminución de la absorción de elementos tóxicos. Por otro lado las interacciones de los hongos ectomicorrícicos con el medio ambiente biótico (hongos saprófitos, patógenos y otros micorrícicos; bacterias y animales del suelo), tienen efecto sobre los ciclos biogeoquímicos (Fynlay 2008).

Parte de la investigación científica sobre los ECMM trata de estudiar todas sus interacciones en la naturaleza con el objetivo de obtener una aplicación práctica eficaz y sostenible en campos, tales como producción y productividad, control biológico, biofertilización y biorremediación, y conservación de la biodiversidad y recursos naturales.

La elevada riqueza específica y funcional de las ECM y la falta de métodos apropiados de investigación habían limitado los estudios de su papel funcional en los procesos de los ecosistemas y los ciclos biogeoquímicos. Sin embargo, las nuevas técnicas que se han desarrollado recientemente están permitiendo explorar in situ la diversidad funcional de las comunidades de ECM. Esta diversidad funcional es la clave para la comprensión de su contribución a los procesos ecológicos necesarios para la gestión sostenible de los bosques, el suelo y la conservación del paisaje (Courty et al. 2010).

2.1. Valoración de la biodiversidad de hongos ectomicorrícicos

La diversidad de las comunidades de ECMM está condicionada por todos los factores que intervienen en el ecosistema donde se desarrollan. En los últimos años el conocimiento de la composición de estas comunidades se hace imprescindible para mejorar los planes de conservación y manejo de los ecosistemas forestales (Comandini et al. 2001). Con este fin, la descripción de las comunidades de ECMM se ha llevado a cabo en base a la monitorización de los cuerpos fructíferos y el estudio de los diferentes morfotipos a nivel de sistema radical (Vogt et al. 1992).

En las primeras etapas de la sucesión de los ecosistemas hay una buena correspondencia entre la riqueza de cuerpos fructíferos y de ECM (Nara et al. 2003), pero en etapas más maduras la riqueza fúngica se hace más compleja y se pierde esta correlación (Nara 2008).

Un estudio basado exclusivamente en la monitorización de las fructificaciones a menudo infravalora la presencia de numerosos taxones debido a que la producción de carpóforos es esporádica y estacional, estando a menudo vinculada a las señales ambientales, tales como la precipitación, la temperatura o la perturbación (Peay et al. 2008). Además, subestima la

abundancia de los hongos resupinados (*Thelephoraceae* o *Sebacinaceae*), los hongos hipogeos, y taxones que carecen de una etapa sexual aparente (Horton y Bruns 2001).

Para dar una caracterización más completa de las comunidades de ECMM es por tanto conveniente realizar estudios de monitorización de las ECM presentes en las raíces y evaluar las poblaciones de hongos ectomicorrícicos activos.

Las puntas de las raíces ECM se pueden clasificar en morfotipos a través de una amplia lista de caracteres morfo-anatómicos definidos por Agerer (1987-2008). Sin embargo, usando este método, sólo se puede atribuir con certeza la especie fúngica a una pequeña fracción de la diversidad de las ectomicorrizas. Los estudios de las comunidades de ECM utilizando métodos sólo morfológicos tienden a producir una estimación errónea de la riqueza (Zambonelli et al. 2012).

En los años 90 comienzan a utilizarse las técnicas moleculares basadas en la PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el estudio de los hongos ectomicorrícicos (Gardes et al. 1991; Gardes y Bruns 1993). En general, el enfoque más común para su identificación a nivel de especie es mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS (internal transcribed spacer) del ADN ribosómico nuclear (ADNr), designada recientemente como marcador universal para los hongos (Schoch et al. 2012). Las secuencias ITS obtenidas se comparan con las contenidas en bases de datos de ADN como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y/o UNITE, (<https://unite.ut.ee/>, Kõljalg et al. 2005, 2013). Esta última contiene únicamente secuencias de hongos. Estas técnicas han permitido identificar como hongos ectomicorrícicos especies como *Tomentella* sp. (Tedersoo et al. 2003, 2006; Courty et al. 2008) o *Clavulina* sp. (Buée y Garbaye 2005) al ser detectadas por primera vez en raíces formando micorrizas. Además, permiten identificar todas las estructuras fúngicas y etapas del ciclo vital de los hongos (Horton y Bruns 2001). Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación (por ejemplo, la secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación) y el aumento del número de secuencias disponibles en las bases de datos permiten evaluar la diversidad de ECM en muchos ecosistemas forestales y comparar las comunidades de hongos ectomicorrícicos entre diferentes estudios.

Aunque no en todos los casos se llega a una identificación a nivel de especie o incluso género, sí es posible asignar morfotipos a uno de los principales linajes (teleforoide, sebacinoide, agaricoide, etc.)

2.2. Un valor añadido a las ectomicorrizas: los hongos ectomicorrícicos comestibles

Unas 1.000 especies de hongos ectomicorrícicos producen cuerpos fructíferos comestibles (Hall et al. 2011), siendo un grupo muy heterogéneo, caracterizado por diferentes estructuras

reproductivas epigeas (setas o pedos de lobo) o hipogea (tipo trufa) (Zambonelli et al. 2012). Pertenecen a los phyla Ascomycota y Basidiomycota por lo que sus nichos ecológicos y comunidades edáficas van a ser muy variables (Smith y Read 2008).

Los hongos ectomicorrícicos comestibles (edible mycorrhizal mushrooms: EECMM) con mayor importancia económica incluyen: seta del César (*Amanita caesarea* (Scop) Pers y especies afines); boletos (*Boletus edulis* Bull y especies afines.); rebozuelos (*Cantharellus cibarius* Fr. y especies afines); niscalos e indigo milk caps (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray y especies afines, *Lactarius indigo* (Schw.) Fr., respectivamente); boleto pringoso (*Suillus luteus* (L.) Roussel sl); erizos (*Hydnum repandum* L. y especies afines); criadilla rosada (*Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr.); *Russula virescens* (Schaeff.) Fr. y otras especies de *Russula* (De Román y Boa 2004; Deschamps 2002; Hall et al. 2003; Härkönen et al. 2003; Ndong et al. 2011; Pérez-Moreno et al. 2008; Pilz y Molina 2002; Pilz et al. 2003; Sitta y Floriani 2008; Trappe et al. 2008; Visnovsky et al. 2010; Wang y Hall 2004; Yang et al. 2008; Sitta y Davoli 2012); y las trufas (*Tuber* spp., principalmente *Tuber magnatum* Pico y *Tuber melanosporum* Vittad).

En contraposición a los hongos saprófitos, los EECMM requieren de una estrategia de producción y “cultivo” asociada a la manutención de su planta hospedadora. Como ejemplos tenemos *Tuber melanosporum* Vittad. (trufa negra), *Tuber aestivum* Vittad. (trufa de Borgoña), *Tuber borchii* Vittad. (trufa bianchetto), *Lactarius deliciosus* (L.) Gray (niscalos) y *Terfezia* sp. (Tul. & C. Tul.) Tul. & C. Tul. La gran mayoría de EECMM son consumidos por recolección silvestre. El mercado mundial de los EECMM se mide en miles de millones de euros (Hall et al. 2003a, 2007).

El valor comercial de los bosques y los sistemas agroforestales puede mejorarse desde el punto de vista de los EECMM, por lo que crece el interés de la conservación y gestión de las poblaciones naturales de estos hongos.

El término “silvicultura fúngica” (Oria de Rueda Salgueiro 2007) o micosilvicultura (Martínez-Peña y Rondet 2008) define prácticas silvícolas que favorecen la producción y diversidad biológica, en particular con enfoque a su valor socioeconómico. Dentro de esta línea surgen dos áreas de investigación y desarrollo para cultivar los EECMM:

1. Gestión de las poblaciones naturales: planteamiento de técnicas para el desarrollo sostenible, la recolección, y la optimización de los rendimientos económicos, junto con la conservación y mejora del hábitat y la diversidad de las especies fúngicas.
2. Micorrización: producción artificial en laboratorio y/o vivero de las simbiosis para su producción en plantaciones a gran escala.

EECMM en Castilla y León

El aprovechamiento del recurso micológico en la Comunidad de Castilla y León comienza en los años 50 y ha alcanzado un elevado grado de desarrollo. Su territorio forestal presenta una gran aptitud para la producción y el aprovechamiento de hongos silvestres comestibles incluyendo las especies más cotizadas en el mercado mundial. La producción media generada por dichos hongos silvestres comestibles, en los montes de Castilla y León, se ha valorado en 91 millones de euros/año, pudiendo llegar a triplicarse este valor en años buenos (Martínez-Peña et al. 2007).

Dentro de los hábitats productores de setas de la comunidad según el Manual para la gestión del recurso micológico en Castilla y León (Martínez-Peña et al. 2011) se incluyen los castaños como sigue:

“Montes claros de *Castanea sativa* productores de *Boletus*. Son en su mayor parte plantíos a marco amplio en terrenos comunales o privados productores de *Boletus* (*B. pinophilus*, *B. aereus* y *B. edulis*), *C. cibarius*, *A. caesarea*, *R. cyanoxantha*, etc. Se encuentran en los terrenos silíceos de las provincias de León (El Bierzo, La Cabrera, la Cepeda, Matagatería y Omaña), Zamora (Aliste, La Carballeda y Sanabria), Salamanca (Estribaciones de la Sierra de Béjar y Gata) y Ávila (Valle del Tiétar e inmediaciones). La vegetación natural acompañante está formada por leguminosas (*Genista florida*, *Cytisus scoparius*, *Genista hystrix*, etc.), ericáceas (*Erica umbelata*, *Calluna vulgaris*, *Erica scoparia*, *Erica australis*, etc.) y cistáceas (*Cistus psilosepalus*, *Pterospartum lasianthum*, *Halimium viscosum*, etc.). En menores superficies en el norte de Burgos (San Zadornil, Valle de Mena y Merindades). Las altitudes oscilan entre los 300 y 1.100 m de altitud. Incluyen masas claras en donde periódicamente se roza el matorral de ericáceas y cistáceas. Buena parte son plantaciones injertadas y sometidas a podas, implantadas en lugares en donde se cultivaban patatas y centeno. No obstante, la mayor parte se encuentran en la actualidad abandonadas y puntisecas, invadidas por matorral senescente y afectadas fuertemente por los incendios forestales. El descuido de estas plantaciones las hace más sensibles además al ataque de las enfermedades del chancro y la tinta. En algunas localidades del sur de Ávila y Salamanca existen montes bajos de castaño muy productivos también desde el punto de vista micológico, sobre todo los asentados en suelos graníticos y aprovechados forestalmente. El castaño cuidado es el ecosistema más productivo de *Boletus* gr. *edulis* en nuestra región, sobre todo cuando los castaños tienen entre 20 y 70 años. Por este motivo resultaría urgente su recuperación ya que sus masas se han reducido a la tercera parte en los últimos 120 años.”

Desde 1989, la Junta de Castilla y León promueve y financia distintas actuaciones y proyectos en materia de educación ambiental, investigación y gestión forestal sostenible de los hongos silvestres comestibles, configurando todo un Programa de Micología Forestal con reconocimiento internacional. En Castilla y León se puso en marcha un proyecto encaminado hacia la ordenación del recurso micológico del territorio en el marco del proyecto LIFE00 ENV/E/544 Myas “Micología y aprovechamiento sostenible” en el se llevó a cabo una experiencia piloto de regulación de la recolección de setas en montes de utilidad pública de la zona de pinares Soria (López et al. 2005).

Más reciente, el proyecto Mycocil (2014-2020) se dedica a la regulación y comercialización de los recursos micológicos en Castilla y León, y propone un modelo de aprovechamiento del recurso micológico que permite incrementar las rentas que genera el sector, a la vez que garantiza la perdurabilidad de este recurso natural.

2.3. Posible manejo de los hongos ectomicorrícicos comestibles: Micorrización

El carácter de simbiote obligado de los EECMM les hace totalmente dependientes de la asociación a su planta huésped para que le suministre los fotosintatos necesarios para su desarrollo y crecimiento (Karwa et al. 2011) y puedan cerrar su ciclo biológico con la producción de cuerpo fructíferos. Por lo tanto, estas especies no pueden cultivarse sobre sustratos orgánicos con en el caso de los hongos saprófitos (Boa 2004), de ahí que la producción de especies EECMM de interés económico depende en su totalidad de las fructificaciones en su ambiente natural.

Sólo unas pocas especies, sobre todo las trufas, se cultivan extensamente por todo el mundo (Hall et al. 2003b; Parladé 2007). La incapacidad para cultivar la mayoría de los EECMM es debido a las dificultades en la obtención de plantas bien micorrizadas y en el mantenimiento de sus micorrizas una vez que se realiza el trasplante a campo (Iotti et al. 2012).

Por tanto desde un punto de vista económico y de revalorización de las masas de castaño sería importante la producción de planta micorrizada de *Castanea sativa* con EECMM.

Aunque no ha sido objeto de estudio de esta memoria de tesis doctoral cabe destacar la importancia que puede tener la obtención de plantas micorrizadas con hongos ECM no comestibles sobre la fisiología de la planta (Martins 2004; Martins et al. 1996, 1997; Carvalho et al. 2013) y como posibles agentes de biocontrol frente a patógenos de raíz (Branzanti et al. 1999).

Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral fueron:

1. Conocer el componente ectomicorrícico asociado a *Castanea sativa* Mill. en el Bierzo y susceptible de ser utilizado en un programa de micorrización en vivero.
2. Obtención de planta micorrizada de calidad en vivero para su uso en revalorización de las masas de *C. sativa*.



CARACTERIZACIÓN DE LAS
COMUNIDADES ECTOMICORRÍICAS
DE LOS CASTAÑARES DEL BIERZO

Capítulo 1

1. Área de estudio

1.1. Localización

Para la realización de la presente memoria de tesis doctoral se han seleccionado ocho parcelas de estudio en la comarca del Bierzo (Figuras 1.1 y 1.2) en masas de *Castanea sativa* Mill. con presencia de sotos y montes bajos. El Bierzo es una región natural originada en la orogenia varisca, al final del Paleozoico. Está situada al oeste de la provincia de León, en la comunidad autónoma de Castilla y León, desde el año 1991 constituye una comarca administrativa formada por 38 municipios. Físicamente se estructura en un cerco montañoso (Sierra del Caurel, la Sierra de los Ancares, la Sierra de Gistredo, los Montes de León y los Montes Aquilanos), con una altitud media superior de 800 msnm, que rodea una «hoya» o depresión central. El acusado desnivel existente entre las áreas montañosas y la depresión central ha favorecido la formación de valles encajados en las primeras, mientras que en la hoya se compone principalmente de materiales sedimentarios depositados durante el Cenozoico y Neozoico.

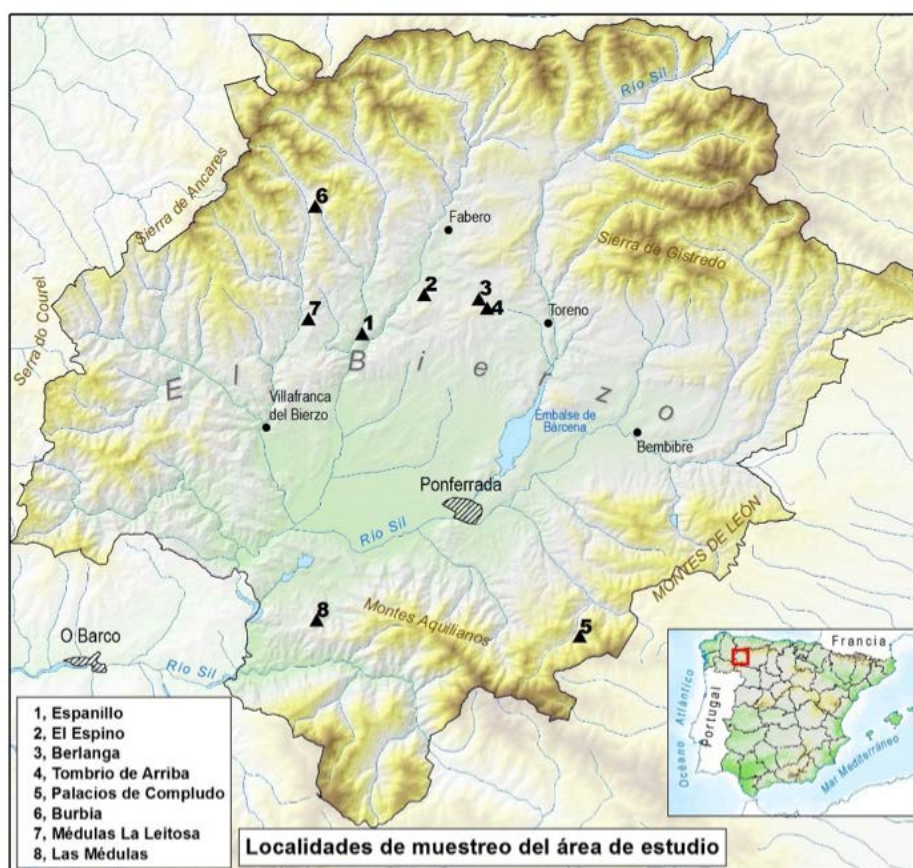


Figura 1.1. Localización de las parcelas de estudio.

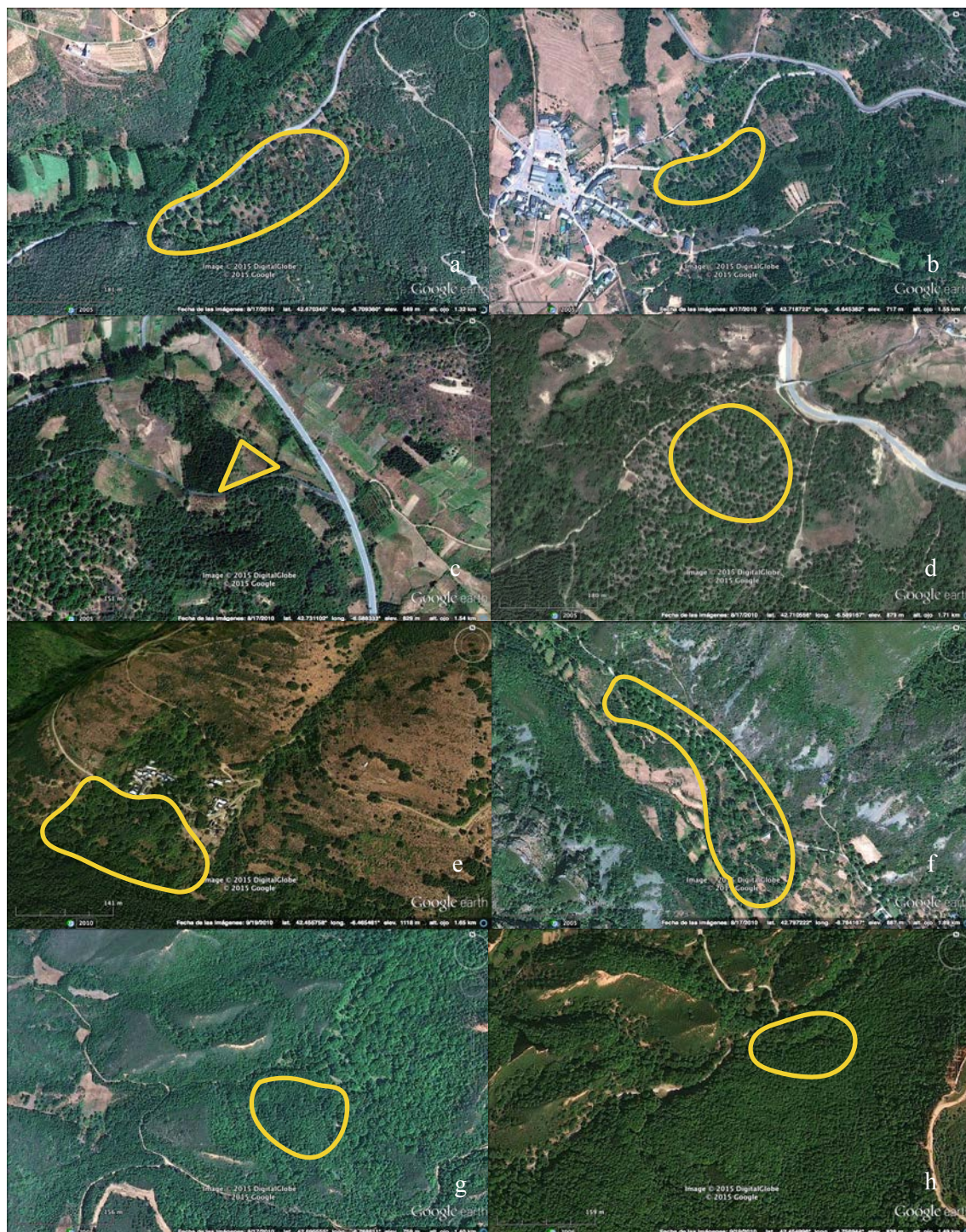


Figura 1.2. Localización de las parcelas de *Castanea sativa* Mill. **a)** Espanillo; **b)** El Espino; **c)** Berlanga del Bierzo; **d)** Tombrio de Arriba; **e)** Palacios de Compludo; **f)** Burbia; **g)** Médulas La Leitosa (Veguellina); **h)** Las Médulas. Fuente: Google Earth Maps (2015).

1.2. Bioclimatología y Biogeografía

Desde un punto de vista bioclimático las parcelas objeto de estudio siguiendo la propuesta de Rivas-Martínez et al. 2011a, presentan un macrobioclima Mediterráneo caracterizado por la existencia de sequía estival (precipitación menor que dos veces la temperatura, $P < 2T$) en al menos dos meses consecutivos del verano. El bioclima es Mediterráneo pluviestacional oceánico con representación de los termotipos meso y supramediterráneo y los ombrotipos subhúmedo y húmedo. Estas características bioclimáticas unidas a las peculiaridades edáficas determinan que la vegetación potencial climatófila dominante esté constituida por encinares y melojares (*Genisto hystricis-Quercetum rotundifoliae* y *Genisto falcatae-Quercetum pyrenaicae*).

Esta realidad bioclimática queda puesta de manifiesto en los datos climáticos y en la diagnosis bioclimática de la estación meteorológica de Tombrio de Arriba (Figura 1.3a) y en los de otras tres estaciones existentes en las proximidades del área de estudio: Villafranca del Bierzo (Figura 1.3b), Puente Domingo Flórez (Figura 1.3c) y Vega de Espinareda (Figura 1.3d).

Biogeográficamente, siguiendo la propuesta de Rivas-Martínez et al. (2014), el área de estudio se incluye en su totalidad en las siguientes unidades: Región Mediterránea, Subregión Mediterránea Occidental, Provincia Mediterránea Ibérica Occidental, Subprovincia Carpetana-Leonesa Sector Berciano-Sanabrés, Distrito Berciano.

TOMBRIO DE ARRIBA (ESP LEON)

Altitude: 790 m.

Latitude: 42° 43'N Longitude: 6° 34'W

Temperature observation period.: 1951-1999 (49)

Rainfall observation period....: 1976-1997 (22)

(C°/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	Epi
Jan.	4.00	8.20	-0.20	17.20	-15.70	111.2	11.83
Feb.	4.90	9.70	0.10	22.10	-12.00	115.0	15.21
Mar.	7.40	13.00	1.80	30.80	-9.40	74.4	30.74
Apr.	9.30	14.90	3.70	28.70	-4.90	67.2	44.18
May.	12.20	18.30	6.20	32.90	-6.00	68.3	68.41
Jun.	16.30	23.00	9.60	37.40	-5.60	61.1	97.75
Jul.	19.10	26.60	11.60	37.70	2.20	22.1	118.72
Aug.	18.70	26.20	11.30	36.00	3.70	19.0	107.72
Sep.	16.30	23.20	9.50	36.20	-0.30	55.5	79.42
Oct.	12.00	17.60	6.30	28.60	-5.70	100.5	50.58
Nov.	7.30	12.10	2.50	24.20	-14.40	115.3	24.02
Dec.	4.40	8.60	0.30	19.80	-14.00	136.3	12.58
Year	10.99	16.78	5.22	29.30	-6.84	946	661.17

Figura 1.3a. Diagnosis bioclimática de las estaciones meteorológicas del Bierzo: Tombrio de Arriba, Mediterráneo pluviestacional-oceánico supramediterráneo inferior húmedo inferior.

VILLAFRANCA DEL BIERZO -CUBE.- (ESP LEON) Altitude: 518 m.

Latitude: 42° 36'N Longitude: 6° 48'W

Temperature observation period.: 1911-1995 (85)

Rainfall observation period....: 1911-1995 (85)

(C°/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	EPI
Jan.	5.10	9.00	1.00	21.00	-9.80	115.7	12.03
Feb.	6.90	11.80	2.00	27.00	-5.90	138.7	18.27
Mar.	9.80	15.50	4.00	27.00	-4.00	106.9	36.36
Apr.	11.50	17.50	5.60	32.00	-4.00	66.7	49.47
May.	14.80	21.10	8.50	37.00	-0.60	57.2	78.04
Jun.	18.20	25.10	11.40	39.40	3.00	37.1	104.59
Jul.	21.20	29.00	13.50	38.00	3.00	18.9	129.32
Aug.	21.10	29.00	13.20	41.00	5.20	22.3	119.54
Sep.	18.30	25.70	11.00	38.00	2.00	51.0	85.61
Oct.	13.40	19.20	7.70	30.40	-1.10	84.8	51.50
Nov.	8.60	13.10	4.20	24.00	-5.00	112.9	24.24
Dec.	5.30	8.70	1.80	22.00	-9.80	147.4	12.05
Year	12.85	18.73	6.99	31.40	-2.25	960	721.02

Figura 1.3b. Diagnósis bioclimática de las estaciones meteorológicas del Bierzo: Villafranca del Bierzo, Mediterráneo pluviestacional-oceánico mesomediterráneo superior subhúmedo superior.

PUENTE DE DOMINGO FLOREZ (ESP LEON)

Altitude: 381 m.

Latitude: 42° 24'N Longitude: 6° 49'W

Temperature observation period.: 1968-1995 (28)

Rainfall observation period....: 1951-1991 (41)

(C°/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	EPI
Jan.	4.90	9.80	0.70	18.10	-9.40	71.4	11.27
Feb.	7.00	12.00	1.10	24.70	-13.00	62.9	18.27
Mar.	9.80	15.60	3.10	27.40	-9.30	48.6	36.19
Apr.	12.50	19.50	5.10	33.00	-4.40	42.5	54.71
May.	15.20	22.00	7.70	36.50	-12.50	47.6	80.22
Jun.	18.20	25.80	10.50	41.80	-4.30	35.3	103.20
Jul.	21.00	29.00	12.50	42.50	1.90	20.4	126.25
Aug.	20.30	28.20	13.00	44.40	2.90	18.5	112.11
Sep.	18.60	26.20	10.90	42.20	-0.40	34.3	87.03
Oct.	13.90	19.80	7.20	39.00	-3.30	60.7	53.59
Nov.	8.50	13.90	3.70	26.80	-8.70	67.8	23.76
Dec.	6.80	10.20	1.50	20.00	-11.50	81.1	16.92
Year	13.06	19.33	6.42	33.03	-6.00	591	723.52

Figura 1.3c. Diagnósis bioclimática de las estaciones meteorológicas del Bierzo: Puente Domingo Flórez, Mediterráneo pluviestacional-oceánico mesomediterráneo inferior subhúmedo inferior.

VEGA DE ESPINAREDA (ESP LEON)

Altitude: 610 m.

Latitude: 42° 43'N Longitude: 6° 39'W

Temperature observation period.: 1981-1995 (15)

Rainfall observation period....: 1951-1991 (41)

(C°/mm)	Ti	Mi	mi	M'i	m'i	Pi	EPI
Jan.	4.40	9.00	-0.10	16.60	-11.40	127.7	11.05
Feb.	5.90	11.30	0.80	23.60	-11.40	102.2	16.27
Mar.	8.80	14.80	2.80	26.00	-9.30	73.7	33.73
Apr.	11.00	17.00	5.20	32.00	-4.10	65.0	49.26
May.	13.50	20.10	6.80	33.30	-1.90	60.7	71.99
Jun.	17.60	24.90	10.10	34.50	2.60	44.5	102.64
Jul.	20.90	30.20	11.50	37.80	3.20	17.8	128.84
Aug.	20.30	28.00	11.80	41.60	3.40	20.8	115.47
Sep.	17.40	24.70	9.80	37.90	-1.30	48.5	82.18
Oct.	12.80	18.90	6.30	29.60	-3.00	82.7	50.71
Nov.	7.90	13.00	3.00	24.00	-8.00	107.8	23.34
Dec.	5.20	10.00	0.50	20.00	-10.00	118.6	13.00
Year	12.14	18.49	5.71	29.74	-4.27	870	698.47

Figura 1.3d. Diagnósis bioclimática de las estaciones meteorológicas del Bierzo: Vega de Espinareda, Mediterráneo pluviestacional-oceánico supramediterráneo inferior subhúmedo superior.

1.3. La vegetación en el área de estudio

La vegetación natural existente en un territorio es una respuesta directa al clima, al suelo y a la actividad humana desarrollada en el mismo. En este sentido, la comarca del Bierzo se caracteriza por ser un área en la que la actividad humana ha modificado de forma notable el paisaje vegetal.

La vegetación natural más representativa que corresponde a las áreas donde se han establecido las parcelas de muestreo y donde en el momento actual se asientan las masas de *Castanea sativa*, puede concretarse por un lado, en la vegetación potencial natural y por otro, en la vegetación modificada por la acción del hombre a partir de la potencial natural

Si hablamos de vegetación potencial, en la que teóricamente la acción antrópica habría sido escasa o nula, nos encontraríamos y nos encontramos con:

Encinares mediterráneos sobre substratos pobres en bases

En los territorios situados en los bordes de la Hoya del Bierzo, sobre todo en el termotipo mesomediterráneo y supramediterráneo inferior, nos encontramos con los encinares rotundifolios berciano-sanabrenses, lusitano durienses y salmantinos de *Genisto hystricis-Quercetum rotundifoliae*. Estas formaciones forestales se desarrollan sobre suelos pobres en bases de carácter seco-húmedo. En el estrato arbustivo destaca la presencia de *Daphne gnidium*,

Ruscus aculeatus, *Cytisus scoparius* subsp. *scoparius*, *Lavandula sampaioana*, *Genista hystrix*, *Crataegus monogyna* y distintas especies de *Cistus* sp. Entre las herbáceas más frecuentes se encuentran: *Rubia peregrina*, *Arenaria montana* subsp. *montana*, *Teucrium scorodonia*, *Silene nutans* subsp. *nutans* y *Clinopodium vulgare*, entre otras.

Encinares mediterráneos sobre substratos ricos en bases

Sobre suelos desarrollados sobre las calizas cristalinas del Caurel, presentes en el Bierzo sobre todo en el bajo Sil, los encinares de *Genista hystrix*-*Quercetum rotundifoliae* se ven enriquecidos en su estrato arbustivo por un notable incremento de la termicidad con la presencia de *Pistacia terebinthus*, *Phillyrea angustifolia*, *Jasminum fruticans*, *Arbutus unedo*, *Lonicera etrusca*, *Asparagus acutifolius* o *Ruscus aculeatus*. En el sotobosque cohabitan otros taxones tales como, *Helleborus foetidus*, *Glandora diffusa*, *Piptatherum paradoxum* o *Carex halleriana*, entre otras.

Melojares mediterráneos

Los bosques de *Quercus pyrenaica* de los territorios meso-supramediterráneos y supratemplados submediterráneos berciano-sanabrenses de ombroclimas subhúmedo-hiperhúmedos oceánicos se desarrollan sobre cambisoles húmicos y raramente en planosoles dístricos y se corresponden con la asociación *Genista falcatae*-*Quercetum pyrenaicae*. El aspecto fenológico más llamativo de estos bosques, es que durante el otoño y gran parte del invierno las hojas secas de *Quercus pyrenaica*, no se desprenden de las ramas (hojas marcescentes), confiriendo un aspecto muy singular a estas formaciones forestales. En el estrato arbustivo son frecuentes *Genista falcata*, *Genista florida* subsp. *polygaliphylla*, *Cytisus scoparius* subsp. *scoparius*, *Erica arborea* y *Crataegus monogyna*. En su estrato herbáceo son abundantes especies tales como: *Holcus mollis*, *Stellaria holostea*, *Physospermum cornubiense*, *Clinopodium vulgare*, *Teucrium scorodonia*, *Melampyrum pratense*, *Festuca elegans* subsp. *merinoi*, *Doronicum plantagineum*, *Aquilegia vulgaris* subsp. *dichroa*, *Brachypodium sylvaticum*, etc.

Sin embargo, y aunque aún existen buen número de bosques como los descritos, en los que *C. sativa* también está presente, es mucho más común que por acción humana, los sotos de castaños aparezcan mucho más frecuentemente ligados a etapas vegetales de sustitución de los mismos, aunque bastante difuminadas, pues el objetivo del cultivo del castaño es determinante para su limpieza periódica.

Estas etapas de sustitución son comúnmente son piornales o escobonales, brezales, cantuesal-jarales, etc. Entre las especies que conforman los piornales o escobonales se encuentran *Genista florida* subsp. *polygaliphylla*, *Genista falcata*, *Cytisus scoparius* subsp. *scoparius*, *Erica arborea*, *Cytisus multiflorus*, *Pteridium aquilinum* entre otras. Si nos encontramos con *Erica australis* subsp. *aragonensis*, *Erica umbellata*, *Erica cinerea*, *Halimium umbellatum*, *Halimium viscosum*, *Pterospartum tridentatum* subsp. *lasianthum*, nos hallaremos en un brezal y si por el

contrario nos encontramos con *Lavandula sampaioana*, *Cistus ladanifer*, *Cistus salvifolius*, *Cistus psilosepalus*, *Cistus populifolius*, estaremos en un cantuesal-Jaral o jaral.

Pero la acción del hombre en muchas ocasiones llega a utilizar antiguas zonas de cultivo, bien sea de secano o en las proximidades de algún curso de agua, en cuyo caso no es infrecuente encontrarnos con especies como *Rubus ulmifolius*, *Rubus caesius*, *Tamus communis* o por el contrario *Festuca pratensis*, *Achillea millefolium*, etc.

Los nombres de los taxa mencionados el texto siguen las propuestas de Flora Iberica (Castroviejo 1986-2012), Flora Europaeae (Tutin et al. 1980) e Itinera Gebotánica (Rivas-Martínez et al. 2011b).

1.4. Usos y suelos de las parcelas estudiadas de *Castanea sativa* Mill.

Se realizó la caracterización del hábitat de ocho castañares de la comarca del Bierzo para compararlo el hábitat descrito para *Castanea sativa* en España en trabajos previos (Gandullo et al. 2004) (Figura 1.5).

Para describir las parcelas de estudio se tomaron características abióticas de *C. sativa* con datos relativos a la fisiografía y al suelo, así como datos relativos al uso y manejo del castaño.

Los datos de masas de *C. sativa* analizadas se ordenan según su uso, (soto de fruto y monte bajo) y por orden ascendente de altitud (Tabla 1.1). Los datos de los parámetros se presentan de la siguiente manera:

1. Características generales y fisiográficas de las parcelas.

Los parámetros fisiográficos con los que se han caracterizado las parcelas seleccionadas han sido: localización en coordenadas geográficas, altitud (ALT), pendiente (PND), posición fisiográfica, microtopografía, orientación, pedregosidad, erosión y drenaje.

Los datos climáticos se refieren a la temperatura media anual (TA) y precipitación media anual (PA), obtenidos a partir del Atlas Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola et al. 2005) (Tablas 1.1 y 1.2, Figura 1.2).

2. Clasificación del tipo de suelo.

En cada parcela de muestreo se procedió también al estudio de un perfil del suelo, identificando los distintos horizontes edáficos, caracterizando su color y tomando una muestra representativa de cada uno de ellos. En el laboratorio se efectuaron los análisis físicos y químicos necesarios de cada horizonte para la clasificación de los suelos (FAO 2006) y para la elaboración de los parámetros edáficos definitorios del hábitat edáfico (Rubio et al. 2000, 2002, Gandullo et al. 2004) (Tabla 1.3).

3. Descripción de cada parcela y su perfil edáfico correspondiente (Tabla 1.4, Figura 1.4).

4. Análisis granulométrico, físicoquímico y bioquímico.

Como parámetros edáficos granulométricos para cada horizonte se han considerado: piedras, grava, gravilla, tierra fina en tierra, arena, limo y arcilla en tierra fina de acuerdo con los límites establecidos por el *Soil Survey Staff*, USDA, 1975), materia orgánica superficial (M.O.S.) (Tabla 1.5).

Como parámetros edáficos físicoquímicos se han analizado: acidez actual (valor del pH en H₂O, en proporción 1:2,5) y acidez de cambio (valor del pH en KCl 1,0 N, en proporción 1:2,5), capacidad de intercambio catiónico (CIC), calcio, (Ca²⁺), magnesio (Mg²⁺), potasio (K⁺) y sodio (Na⁺) de cambio (Tabla 1.6).

Como parámetros edáficos bioquímicos se estudiaron el carbono orgánico edáfico (COS), nitrógeno total edáfico (N_t), relación carbono/nitrógeno (C/N) y fósforo (P), calcio (Ca) y potasio (K) asimilables (Tabla 1.7).

Tabla 1.1: Características fisiográficas y climáticas de las parcelas. ALT= altitud;TA= Temperatura media anual, PA= Precipitación media anual.

Localidad	Tipo castañar	Coordenadas Geográficas	ALT (m)	TA (°C)	PA (mm)
Espanillo	Soto antropizado	42.66972, -6.7	547	11,56	1069
El Espino	Soto enfermo	42.71861, -6.64527	720	11,21	1101
Berlanga del Bierzo	Soto encalado	42.731, -6.5883	828	11,01	1068
Tombrio de Arriba	Soto antropizado	42.7105, -6.58916	870	10,68	1001
Palacios de Compludo	Soto antropizado	42.455, -6.4661	1090	9,77	1080
Burbia	Soto antropizado	42.7972, -6.78416	1120	9,16	1280
Médulas La Leitosa (Veguellina)	Monte bajo	42.695, -6.76861	762	10,98	977
Las Médulas	Monte bajo	42.4550, -6.75694	874	10,33	880

Tabla 1.2: Fisiografía de las parcelas. Or.: orientación.

Localidad	Pendiente	Posición fisiográfica	Microtopografía	Or.	Pedregosidad	Erosión	Drenaje
Espanillo	Suave 5%, abrupta en altura	Ladera, parte baja	Pequeñas concavidades	SE	Muy abundante	Ladera no estabilizada	Externo malo, interno bueno
El Espino	Inclinada, 7 %	Ladera, parte media	En terracitas	N	Escasa	Escasa	Externo bueno, interno lento
Berlanga del Bierzo	Inclinada, 12 %	Ladera, parte media	En surcos de laboreo	NO	Abundante superficial	No	Externo bueno, interno lento
Tombrio de Arriba	Inclinada, 8%	Ladera, parte media	Llana, lateralmente zanjas de riego	SE	Abundante en superficie	Escasa	Externo bueno, interno regular a malo
Palacios de Compludo	Inclinación suave 7 %, fondo de terraza	Parte baja de aterrazamiento	Terraza artificial	S	Frecuentes gravas	Derrumbes de terraza, con movimiento de suelo	Externo lento, interno bueno.
Burbia	Suave, 3 %	Ladera, parte baja	Antiguo aterrazamiento, en terraza colgada	O	Abundante	No	Externo bueno a lento, interno bueno
Médulas La Leitosa (Veguellina)	Suave, 3%	Parte baja de pendiente	Ondulaciones pequeñas	W	Frecuente	Provocada, antrópica	Externo bueno, interno lento
Las Médulas	Inclinada, 12%	Ladera, parte media	Natural	NO	Abundantes gravillas y bolos cuarcíticos y de cuarzo	Solo provocada por el camino	Externo bueno, interno lento

Tabla 1.3: Características generales de los suelos de las parcelas. *Unidades de suelo según *F.A.O.* (2006).

Localidad	Tipo castañar	Tipo de perfil	Tipo suelo*	Material originario	Textura
Espanillo	Soto antropizado	<i>Ah/Ap/BC/C</i>	<i>Regosol colúvico</i>	Derrubio de esquistos muy troceados	Francoarenosa
El Espino	Soto enfermo	<i>Ah/Ap/Bw/C</i>	<i>Cambisol háplico</i>	Alteración de esquistos	Francolimosa y Arcillolimosa
Berlanga del Bierzo	Soto encalado	<i>Ap/ABw/BwC</i>	<i>Cambisol háplico</i>	Coluvial de cuarcitas y limos	Francolimosa
Tombrio de Arriba	Soto antropizado	<i>Ah/Bw/Bt</i>	<i>Alisol háplico</i>	Rañoide sobre esquistos muy alterados y cuarcitas.	Francolimosa
Palacios de Compludo	Soto antropizado	<i>ABw/Bw/BC</i>	<i>Regosol colúvico</i>	Coluvial de pizarras y esquistos	Limosa y Francolimosa
Burbia	Soto antropizado	<i>Ah/ABw/Bw</i>	<i>Regosol colúvico</i>	Coluvial de cuarcitas y cuarzo. Esquistos metamórficos	Francolimosa
Médulas La Leitosa (Veguellina)	Monte bajo	<i>O/A/Bw/Bw2</i>	<i>Cambisol háplico</i>	Sedimento rojo y cuarcítico proveniente del derrumbe romano	Francolimosa
Las Médulas	Monte bajo	<i>O/Ah/A/Bw/2C1/2C2</i>	<i>Cambisol háplico</i>	Esquisto fuertemente meteorizado	Francolimosa

Descripciones de las parcelas y perfiles edáficos

1. Espanillo (Figuras 1.2a y 1.4a)

Capa de hojarasca discontinua de erizos y hojas. Perfil muy delgado, en formación, con un *Ah* de 1,0 a 2,0 cm de espesor, seguido de un posible *Ap* endurecido por pisadas, delgado, que pasa a un coluvión de gravilla esquistosa, muy troceada, con alguna piedra; algo más profundo en el lugar de muestreo, suelto y permeable, pero que debe ser más delgado hacia la parte alta. Se observa pavimento de piedritas, debido a la erosión laminar por impermeabilidad. Tiene signos de fertilización o introducción de ganado (altos contenidos de P asimilable), pero debe sufrir escasas roturaciones (alta relación C/N).

Vegetación: *Castanea sativa*, *Cytisus scoparius*, *Genista falcata*., *Festuca sp.*, *Quercus rotundifolia*, *Erica arborea*; *Rubus ulmifolius*.

Uso: Soto, castañar de fruto.

Condiciones de humedad: Seco.

Salinidad: No.

Influencia humana: Recogida de fruto y pastoreo temporal.

Observaciones: Se tomaron el *Ah* + *Ap* conjuntamente para muestreo y, luego, el *BC*.

2. El Espino (Figuras 1.2b y 1.4b)

Perfil profundo, de carácter limoso, muy enraizado; en superficie tiende a encostrarse y hacerse impermeable, quizás evitado por laboreo (ocasional); el posible *Ap* puede llegar hasta la línea de piedras; horizonte cámbico más rojizo que el material alterado, más amarillento. Es posible que reciba fertilizaciones esporádicas y/o introducción de ganado (alto contenido en P asimilable).

Vegetación: *Castanea sativa*, *Pteridium aquilinum*, *Genista florida* subsp. *polygaliphylla*., *Lotus corniculatus*, *Digitalis purpurea*.

Uso: Soto, castañar de fruto.

Condiciones de humedad: Húmedo en profundidad.

Salinidad: No.

Influencia humana: Se rotura cada cierto tiempo.

Observaciones: Se tomaron el *Ah*+*Ap* conjuntamente. Fuerte afectación de chancro y quizás también tinta.

3. Berlanga del Bierzo (Figuras 1.2c y 1.4c)

Perfil profundo de carácter de franco a limoso, con abundantes piedras de cuarcitas subangulares, con caras lisas y gravas subredondeadas; se endurece bajo la capa de labor por su carácter limoso; en el interior continúan las piedras y gravas; en profundidad es más friable y poroso. Roturado pero no fertilizado, aunque parece ser que ha debido ser alguna vez encalado, dado la alta saturación del complejo de cambio (posiblemente al reinstalar el castañar).

Vegetación: *Castanea sativa*, *Rubus ulmifolius*, *Quercus pyrenaica*, *Achillea millefolium*, *Crepis vesicaria*, *Medicago sativa*.

Uso: Castañar nuevo (soto 4 años).

Condiciones de humedad: Seco en superficie; subhúmedo en profundidad.

Salinidad: No.

Influencia humana: Laboreo del castañar frutos. Tiene indicios de haber sido encalado.

4. Tombrio de Arriba (Figuras 1.2d y 1.4d)

Perfil profundo, con un escaso horizonte *Ah*, pedregoso en superficie (a pesar del despedregado) que en el perfil supera los 30 cm de potencia; parece existir línea de piedras hacia esa profundidad, decreciendo la pedregosidad y volviéndose la matriz más rojiza. Las piedras cuarcíticas son poco rodadas, de angulares a subangulares, con orla de meteorización muy diversa en intensidad y profundidad. Debe entrar ganado a deducir del regular contenido de P asimilable, con alguna roturación esporádica.

Vegetación: *Castanea sativa*, *Rubus ulmifolius*, *Quercus pyrenaica*, *Achillea millefolium*, *Crepis vesicaria*, *Medicago sativa*.

Uso: Castañar de fruto.

Condiciones de humedad: seco a semihúmedo en profundidad.

Salinidad: No.

Influencia humana: Despedregado, quema y laboreo ocasionales.

Observaciones: Por dificultad de excavación (pedregoso y seco) sólo se muestreó hasta los -45 cm.

5. Palacios de Compludo (Figuras 1.2e y 1.4e)

Perfil profundo, producto de acumulación por aterrazamiento artificial, en abandono, homogéneo; algunos castaños (> 50 años) muestran curvatura por movimiento del suelo. Escasa hojarasca que deja el suelo desnudo. El horizonte *Ah* es minúsculo (de unos 2 mm de espesor). La distinción entre horizontes es difícil y se ha establecido en función del enraizamiento de herbáceas y la disminución de pedregosidad en profundidad. Afectado por ganadería y/o posible fertilización.

Vegetación: *Castanea sativa*, *Rubus ulmifolius*, *Quercus pyrenaica*, *Achillea millefolium*., *Crepis vesicaria*, *Medicago sativa*.

Uso: Soto, castañar de fruto con aprovechamiento ganadero. Antropizado por rotaciones.

Condiciones de humedad: Seco.

Salinidad: No.

Influencia humana: Soto de castañas y ganado equino.

6. Burbia (Figuras 1.2f y 1.4f)

Suelo profundo, con una capa de hojarasca permanente de unos 2,0 cm de espesor superpuesta al suelo; profundidad desigual en contacto con pedrizas subyacentes; posibles antiguas terrazas abandonadas y colgadas por el nivel del río actual; permeable y bien colonizado de insectos. Afectado por la fertilización y/o ganadería (alto contenido de P asimilable), pero escasamente roturado.

Vegetación: *Castanea sativa*, *Festuca pratensis*, *Genista florida* subsp. *polygaliphylla*, *Cytisus scoparius* subsp. *scoparius*, *Digitalis purpurea*.

Uso: Soto muy viejo (castaños entre 300-400 años)

Salinidad: No.

Influencia humana: Posible riego artificial abandonado, al igual que la labor y pradera.

Observaciones: Se tomaron conjuntamente el horizonte *Ah* y el *ABw*.

7. Médulas La Leitosa (Veguellina) (Figuras 1.2g y 1.4h)

Capa de hojarasca continua de unos 5,0 cm de espesor, mayormente procedente de castaños y robles, que se descomponen en unos dos años, con olor a móder, sin hifas de hongos; la transición entre ésta y el horizonte superficial del suelo es abrupta. Perfil homogéneo y profundo de sedimento limoso, rojizo, con gravas angulares de cuarcitas. Roturado pero no fertilizado, siendo pobre en P y K asimilables.

Vegetación: *Castanea sativa*, *Quercus pyrenaica*, *Rubus ulmifolius*, *Pteridium aquilinum*.

Uso: Monte bajo, repoblación joven (5 a 15 años).

Salinidad: No.

Influencia humana: Antigua explotación aurífera romana.

8. Las Médulas (Figuras 1.2h y 1.4g)

Capa de hojarasca discontinua sobre el suelo con, zonalmente, aparición de musgo. Perfil regularmente profundo, material coluvial con abundantes gravillas, sobre esquistos muy meteorizados; abigarrado de colores rojos y amarillos compactos que denota mal drenaje en profundidad. El suelo es pobre en P asimilable.

Vegetación: *Castanea sativa*, *Pteridium aquilinum*, *Genista florida* subsp. *polygaliphylla*, *Lotus corniculatus*, *Digitalis purpurea*.

Uso: Monte bajo en abandono, con algún ejemplar trasmocho, a partir de antiguo soto.

Condiciones de humedad: Seco.

Salinidad: No.

Influencia humana: Monte bajo en abandono, procedente de soto.

Observaciones: Se tomaron al *Ah+A* conjuntamente en una sola muestra. No se tomó muestra del horizonte *2C* por su escasez en tierra fina.

Tabla 1.4: Descripción de los perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill.

Espanillo (Figura 1.4.a)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
0 2	<i>Ah</i>	10YR 3/3 pardo amarillento oscuro, seco, arenolimoso, tendencia de grumoso a particulado, unido por hifas de hongos, débil; muy abundantes poros vesiculares e intersticiales; pocas raíces finas, muy abundante pedregosidad predominantemente del tamaño de grava, pocas piedras; transición neta a
12	<i>Ap</i>	10YR 5/4 pardo amarillento, arenolimoso; gravilla dominante; compactado, duro, que rompe en particular; pocas raíces finas, pocos poros intersticiales; transición ondulada y neta a
50	<i>BC</i>	75YR 5/6, pardo fuerte; seco; arenoso; con gravilla dominante, suelto, particulado; abundantes poros intersticiales frecuentes raíces de todo tamaño, con tendencia horizontal, decreciendo en profundidad; pocas piedras; transición horizontal y gradual
+ 50	<i>C</i>	Mismo material de coluvio de pizarras troceadas hasta tamaño gravilla

Tabla 1.4 (continuación): Descripción de los perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill.

El Espino (Figura 1.4.b)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
0	<i>Ah</i>	10YR 5/3 pardo, seco, franco; de estructura granular a angular, firme; muy abundantes poros intersticiales que disminuyen en zonas que se vuelve laminar, duro; abundantes raíces finas y medianas, horizontales y verticales; frecuente gravilla; con signos de actividad mesofaunística; pocas gravas y frecuentes gravillas; transición ondulada y difusa a
4		
15	<i>Ap</i>	10YR 5/4 pardo amarillento, semihúmedo; franco; estructura subangular firme; frecuentes poros intersticiales y tubulares; abundantes raíces finas y muy finas, por zonas; en límite a horizonte inferior pocas piedras angulares de cuarzo y cuarcita rojiza; transición ondulada y neta a
50	<i>Bw</i>	75YR 5/6, pardo fuerte; húmedo, arcillolimoso; estructura angular, friable a firme; abundantes poros intersticiales; en la parte superior muy abundantes raíces medianas y pocas gruesas, éstas hacia transición inferior con tendencia horizontal, con abundantes raíces medianas y finas; poca gravilla; transición difusa y plana a
+ 50	<i>C</i>	Abigarrado de 10YR 6/4 pardo amarillento claro, húmedo; arcillolimoso; subangular, friable; abundantes poros intersticiales; pocas raíces medianas y gruesas; frecuentes gravas y piedras

Berlanga del Bierzo (Figura 1.4.c)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
0	<i>Ap</i>	10YR 7/4, pardo pálido; seco, franco, grumoso a granular, friable, muy abundantes poros intersticiales, abundantes raíces finas y muy finas; frecuentes gravas cuarcíticas y piedras subangulares con caras lisas; transición irregular y abrupta a
10		
30	<i>Bw</i>	10YR 6/6, amarillo parduzco, seco, franco, angular, fuerte a duro; pocos poros intersticiales y tubulares; pocas raíces finas y muy finas, muy pocas medianas, con tendencia horizontal; frecuentes gravas subredondeadas y pocas piedras cuarcíticas; transición ondulada y gradual a
+60	<i>BwC</i>	75YR 5/8, pardo fuerte, seco o subhúmedo; limoso; subangular a angular, friable a firme; frecuentes poros intersticiales y tubulares; pocas raíces medianas de tendencia horizontal y abundantes muy finas; frecuentes gravas y pocas piedras cuarcíticas; el material continúa a 60 cm con las mismas características

Tabla 1.4 (continuación): Descripción de los perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill.

Tombrio de Arriba (Figura 1.4.d)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
0	<i>Ah</i>	10YR 4/3 (seco) y 3/3 (húmedo) pardo oscuro; limoarenoso; granular a migajoso, friable; muy abundantes poros vesiculares todos tamaños; abundantes piedras de cuarcitas subangulares con diferente grado de meteorización; a veces haciendo separación con horizonte subyacente; transición neta a
4		
4	<i>Bw</i>	10YR 5/8 pardo amarillento, semihúmedo, limoarenoso, angular, moderada, friable; abundantes poros intersticiales y pocos vesiculares; abundantes gravas y gravillas y frecuentes piedras; muy abundantes raíces finas y pocas gruesas que se hacen frecuentes y horizontales en transición con el horizonte inferior; transición gradual y plana (no se ve clara separación por líneas de piedras)
25		
+ 60	<i>Bt</i>	5YR 4/6 rojo amarillento en rotura de agregados y 5YR 5/8 rojo amarillento en superficie de agregados, semihúmedo; limoarenoso, angular, fuerte; cutanes localizados y finos (a la lupa); poros intersticiales abundantes y pocos tubulares finos; pocas raíces; abundantes gravas y gravillas y pocas piedras; este horizonte continúa en profundidad en transición gradual a material de fuerte meteorización de esquistos y creciente impermeabilidad.

Palacios de Compludo (Figura 1.4.d)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
0	<i>ABw</i>	25Y 7/4 amarillo pálido, seco; arenolimoso; angular a subangular, friable a firme; localmente granular fino, con tendencia a masivo; pocos poros intersticiales y vesiculares; frecuentes raíces finas y muy finas verticales; abundantes gravas y gravillas; transición plana y difusa a
20		
50	<i>Bw</i>	Mismas características que el anterior pero con frecuentes raíces medianas, con tendencia horizontal y pocas finas verticales; con algo de mayor pedregosidad de esquistos de tamaño gravas, aplanados; transición gradual y difusa a
+ 90	<i>BC</i>	25YR 5/4 pardo oliva claro, semihúmedo; arenolimoso, carácter más angular, friable; pocas raíces gruesas horizontales y frecuentes medianas con tendencia subhorizontal; disminuye la pedregosidad, aunque se mantiene la abundante grava y gravilla

Tabla 1.4 (continuación): Descripción de los perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill.

Burbia (Figura 1.4.f)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
+2	<i>O</i>	Horizonte de hojarasca
0	<i>Ah</i>	10YR 3/2 pardo grisáceo muy oscuro, seco, arenolimoso; subangular, firme; abundantes raíces finas y muy finas; abundantes poros intersticiales, poros vesiculares; evidente actividad biológica; frecuente pedregosidad superficial de piedras de pizarra angulares, mostrando caras de rompimiento tabular; abundantes gravas; transición plana y neta a
4		
30	<i>ABw</i>	10YR 3/6 pardo amarillento oscuro, seco; arenolimoso; suelto; abundantes poros vesiculares; frecuentes raíces medianas y finas con tendencia horizontal; muy abundante gravilla y frecuentes piedras que finalmente están alineadas y empaquetadas, angulares de pizarra; transición plana y gradual a
50	<i>Bw</i>	10YR 4/6 pardo amarillento oscuro, seco; limoarenoso, suelto; abundantes poros vesiculares; muy abundantes raíces gruesas y medianas, horizontales, pocas muy gruesas y frecuentes medianas; abundantes gravillas, pocas gruesas del mismo material; transición abrupta y plana a piedras laminares muy grandes que forman posiblemente una pedriza en profundidad, de esquistos metamórficos y cuarzo

Médulas La Leitosa (Veguellina) (Figura 1.4.h)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
+5	<i>O</i>	Horizonte de hojarasca continua
0	<i>A</i>	Abigarrado de 5YR 5/8 y 4/6, rojo amarillento, seco; franco; grumoso a subangular, friable, abundantes raíces pequeñas y medianas, pocas gruesas, con tendencia horizontal; abundantes poros vesiculares, frecuentes gravas y gravillas angulares de cuarzo y cuarcita; transición ondulada y neta a
8		
38	<i>Bw₁</i>	5YR 5/8 rojo amarillento, seco; franca; con tendencia a laminar en paquetes, pero que rompe a angular, friable; frecuentes poros intersticiales y tubulares; abundantes raíces entre 18 y 32 cm, medianas y finas, tendencia horizontal a subhorizontal; pocas gravas; transición horizontal y difusa a
+ 60	<i>Bw₂</i>	5YR 5/8 rojo amarillento, semihúmedo; franca; con tendencia a laminar en paquetes, pero que rompe a angular, friable; pocas raíces medianas, abundantes muy finas; pocas gravillas; continúa mismo material en profundidad decreciendo el enraizamiento

Tabla 1.4 (continuación): Descripción de los perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill.

Las Médulas (Figura 1.4.g)

Profundidad en centímetros del horizonte	Esquema horizontes	Descripción
Variable	<i>O</i>	Horizonte O superior, discontinuo, a veces existe musgo
0	<i>Ah</i>	Muy delgado horizonte, que en su parte superior posee muy abundantes bolitas fecales muy pequeñas, de color negruzco; a veces es delgado, de menos de 1 cm; con hifas de hongos
2		
18	<i>A</i>	75YR 5/8 pardo fuerte, seco; limoso; subangular firme, hay abundantes poros intersticiales; abundantes raíces, a veces muy abundantes localmente, medianas y finas; muy abundante gravilla; frecuentes piedras angulares de cuarzo y cuarcita; las raíces tienden a horizontales en parte inferior; transición ondulada y neta a
30	<i>Bw</i>	Abigarrado de 25YR 1/8 rojo y 5YR 6/8 amarillo rojizo, seco; arenolimoso; subangular, firme a duro; frecuentes gravas que localmente se hacen abundantes; pocas piedras angulares; transición irregular y neta a
50	2C1	Abigarrado de 25YR 4/8 rojo y 75YR 7/8 amarillo rojizo, seco; finoarenolimoso angular friable a firme, tendencia a compacto; pocas raíces medianas y muy pocas gruesas, verticales; transición ondulada y gradual a
80	2C2	Material esquistos menos meteorizado con mismos colores y mismas características que el anterior, pero más compacto

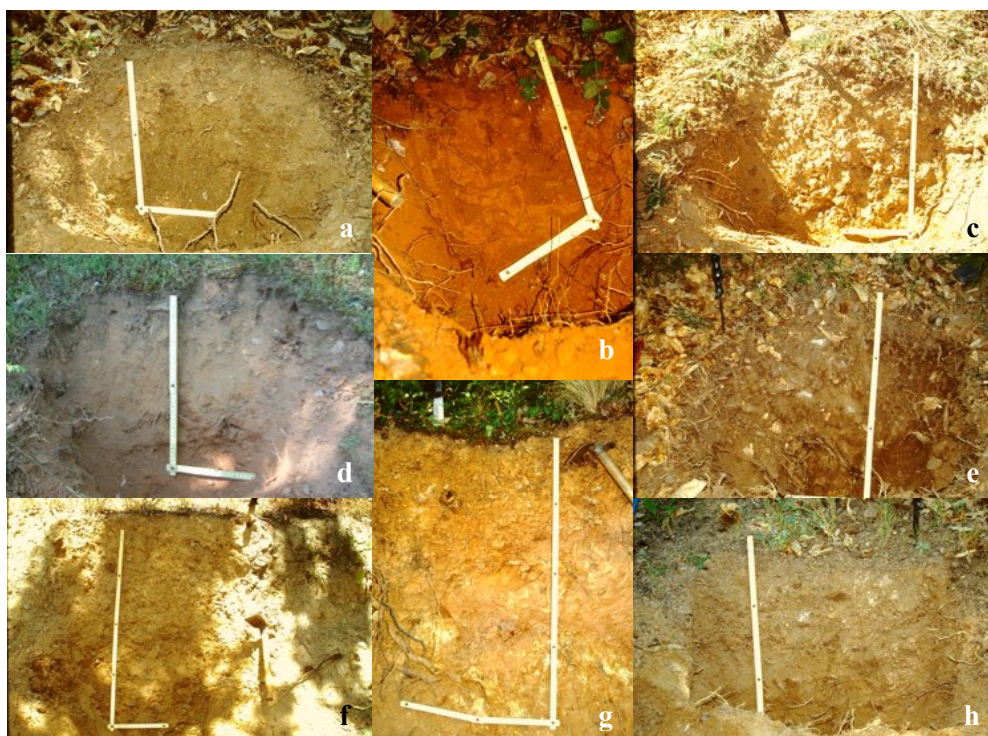


Figura 1.4. Perfiles edáficos de las parcelas de *Castanea sativa* Mill. **a)** Espanillo; **b)** El Espino; **c)** Berlanga del Bierzo; **d)** Tombrio de Arriba; **e)** Palacios de Compludo; **f)** Burbia; **g)** Las Médulas; **h)** Médulas La Leitosa (Veguellina).

Tabla 1.5: Granulometría de los perfiles de las parcelas. M.O.S. = materia orgánica superficial.

Perfil	Horizonte	Profundidad (cm)	Piedras (>10 mm; %)	Gravas (5-10 mm; %)	Gravillas (2-5 mm; %)	Tierra fina (<2 mm; %)	Arena gruesa (%)	Arena fina (%)	Limo grueso (%)	Limo fino (%)	Arcilla (%)	M.O.S. (%)
Espanillo	<i>Ah+Ap</i>	0 a 12	16	17	26	41	41	8	7	26	12	8,1
	<i>BC</i>	12 a 50	20	14	31	34	46	17	1	12	13	1,0
El Espino	<i>Ah+Ap</i>	0 a 15	7	7	16	71	12	6	12	39	24	5,6
	<i>Bw</i>	15 a 50	7	4	10	79	10	10	7	43	30	2,5
	<i>C</i>	> 50	6	4	7	83	9	9	7	46	30	2,1
Berlanga de El Bierzo	<i>Ap</i>	0 a 10	12	3	5	80	15	18	12	30	21	3,3
	<i>Bw</i>	10 a 30	3	0	7	90	12	11	14	36	23	2,9
	<i>BC</i>	30 a 60	7	0	4	89	13	5	21	35	22	2,0
Tombrio de Arriba	<i>Ah</i>	(0-4)	41	21	38	86	14	25	11	31	15	5,6
	<i>Bw</i>	(4-25)	40	20	40	71	11	24	12	34	19	1,2
	<i>B</i>	(25-40)	36	24	39	68	11	22	8	31	26	0,9
Palacios de Compludo	<i>A+Bw</i>	0 a 20	17	9	13	61	27	12	18	28	8	3,1
	<i>Bw</i>	20 a 50	18	9	15	57	19	26	8	28	14	1,6
	<i>BC</i>	50 a 90	16	8	12	63	30	16	9	27	13	1,1
Burbia	<i>Ah+ABw</i>	0 a 30	28	8	9	55	26	5	19	28	10,0	11,6
	<i>Bw</i>	30 a 50	20	13	16	50	25	16	11	30	10	5,3
	<i>Ah</i>	0 a 8	10	9	9	72	8	27	11	32	15	3,9
Médulas de La Leitosa (Veguellina)	<i>Bw-I</i>	8 a 38	9	2	3	86	7	28	14	28	20	1,1
	<i>Bw2</i>	38 a 60	8	2	4	86	10	23	13	36	13	0,5
	<i>Ah+A</i>	0 a 18	21	9	12	58	20	19	3	32	21	4,1
Las Médulas	<i>Bw</i>	18 a 30	16	11	10	63	35	8	6	35	13	1,0

Tabla 1.6: Datos fisicoquímicos de los perfiles de las parcelas. pH (KCl)=acidez actual; pH (H₂O)=acidez de cambio; CIC=capacidad de intercambio catiónico; Ca²⁺= calcio de cambio; Mg²⁺= magnesio de cambio; K⁺=potasio de cambio; (Na⁺)=sodio de cambio.

Perfil	Horizontes	Profundidad (cm)	pH (KCl)	pH (H ₂ O)	CIC (cmol _e /kg)	Ca ²⁺ (1/2cmol _e /kg)	Mg ²⁺ (1/2cmol _e /kg)	K ⁺ (cmol _e /kg)	Na ⁺ (cmol _e /kg)	Suma de bases (cmol _e /kg)	Saturación (%)
Espanillo	Ah+Ap	0 a 12	4,2	5,4	15,3	4,3	2,4	0,9	0,1	7,7	50
	BC	12 a 50	3,8	5,4	8,4	0,8	1,0	0,6	t	2,4	29
El Espino	Ah+Ap	0 a 15	3,4	4,5	12,5	1,0	0,7	0,7	0,7	3,1	24
	Bw	15 a 50	3,4	4,2	11,2	0,2	0,2	0,3	0,6	1,3	12
	C	> 50	3,6	4,1	10,9	0,2	0,3	0,3	0,5	1,3	12
Berlangua de El Bierzo	Ap	0 a 10	4,0	5,2	7,2	2,8	1,3	0,8	0,6	5,5	76
	Bw	10 a 30	3,8	5,2	5,6	3,1	1,4	0,4	0,2	5,1	91
	BC	30 a 60	3,9	5,4	5,4	3,4	1,7	0,4	0,6	6,1	100
Tombrio de Arriba	Ah	(0-4)	3,8	4,7	9,0	0,9	0,3	0,4	t	1,6	18
	Bw	(4-25)	3,6	4,8	6,0	0,3	t	0,2	t	0,5	8,4
	B	(25-40)	3,5	4,9	5,8	0,3	0,1	0,2	t	0,6	9,6
Palacios de Compludo	A+Bw	0 a 20	4,1	5,4	7,2	2,9	0,8	0,4	0,3	4,4	61
	Bw	20 a 50	3,2	4,6	6,2	0,5	0,2	0,3	0,4	1,4	23
	BC	50 a 90	3,1	4,5	6,1	0,2	t	0,3	0,1	0,6	10
Burbia	Ah+ABw	0 a 30	3,4	4,5	15,8	0,9	0,5	0,5	0,6	2,5	16
	Bw	30 a 50	3,7	4,7	13,6	0,2	0,1	0,3	0,3	0,9	7,0
Médulas de La Leitosa (Veguellina)	Ah	0 a 8	4,0	5,0	6,2	1,9	0,5	0,3	0,4	3,1	50
	Bw1	8 a 38	3,4	4,5	4,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	11
	Bw2	38 a 60	3,5	4,6	5,8	0,2	t	0,1	t	0,3	5,0
Las Médulas	Ah+A	0 a 18	3,3	4,5	10,4	0,3	0,8	0,3	0,1	1,5	14
	Bw	18 a 30	4,3	5,3	5,3	0,5	1,4	0,2	0,1	2,2	42

Tabla 1.7: Datos bioquímicos de los perfiles de las parcelas. COS=carbono orgánico superficial); Nt=nitrógeno total edáfico; C/N=relación carbono/nitrógeno, P=fósforo; Ca=calcio; K=potasio.

Perfil	Horizontes	Profundidad (cm)	COS (mg/g)	Nt (mg/g)	C/N	P asimilable (mg/kg)	Ca asimilable (mg/kg)	K asimilable (mg/kg)
Espanillo	Ah+Ap	0 a 12	47,1	2,53	18,6	161	837	269
	BC	12 a 50	5,9	0,82	7,2	97	260	134
El Espino	Ah+Ap	0 a 15	32,7	2,24	14,6	15,4	364	120
	Bw	15 a 50	14,5	1,17	12,4	12,6	170	34
	C	> 50	12,1	1,29	9,4	6,3	182	46
Berlanga de El Bierzo	Ap	0 a 10	18,9	1,65	11,5	4,9	643	204
	Bw	10 a 30	16,6	1,65	10,1	1,2	752	59
	BC	30 a 60	11,8	1,37	8,6	2,1	748	57
Tombrio de Arriba	Ah	(0-4)	32,3	2,0	16	12	165	151
	Bw	(4-25)	6,7	0,8	8	17	22	70
	B	(25-40)	5,2	0,8	7	19	44	64
Palacios de Compludo	A+Bw	0 a 20	18,0	1,54	11,7	58	718	87
	Bw	20 a 50	9,0	0,91	9,9	70	199	58
	BC	50 a 90	6,4	0,95	6,7	95	175	59
Burbia	Ah+ABw	0 a 30	58,1	3,53	16,5	130	260	88
	Bw	30 a 50	30,5	2,10	14,5	115	160	40
Médulas de La Leitosa (Véguelina)	Ah	0 a 8	22,6	1,33	17,0	4,5	591	47
	Bw1	8 a 38	6,3	0,59	10,7	3,5	142	20
	Bw2	38 a 60	2,9	0,29	10,0	3,5	166	21
Las Médulas	Ah+A	0 a 18	27,0	1,70	15,9	3,5	168	52
	Bw	18 a 30	5,0	0,80	6,3	0,7	237	18

Castanea sativa en el Bierzo se sitúa dentro del hábitat central descrito para los castaños españoles (Blanco et al. 2000; Rubio et al. 2002; Gandullo 2004).

Los castaños estudiados se sitúan en terrenos ondulados con altitudes que oscilan entre los 500 y 1.100 m. La precipitación media anual indica un clima húmedo pero no excesivamente lluvioso (precipitación media de las parcelas 1.057 mm) existiendo un período de sequía estival en al menos dos meses consecutivos del verano (precipitación menor que dos veces la temperatura, $P < 2T$).

Los suelos estudiados, de acuerdo con la clasificación propuesta por la FAO (2006) se incluyen dentro del grupo de suelos poco evolucionados, esto es, principalmente *Regosoles* o *Cambisoles*, salvo algún *Luvisol*.

El material parental de los suelos es siempre de naturaleza silíceo (cuarcitas) o esquistos más o menos cuarcíferos. Las clases texturales que aparecen son franca y francolimoso, fundamentalmente. La presencia de calcio activo es muy baja.

Son suelos de fuerte a muy fuertemente ácidos, con pedregosidad abundante y baja cantidad de materia orgánica edáfica, por lo que la relación C/N no es elevada, quizás por la influencia del arado. La mineralización es media con humus principalmente de tipo Mull.

Desde el punto de vista silvícola y coincidiendo con lo observado para los castaños castellanos (Rubio et al. 2002) se distinguen dos conjuntos de parcelas:

1. Las de castaño bravo con posibilidad de aprovechamiento maderero: en monte bajo, con fuerte densidad de arbolado y con buena regeneración. No tenemos constancia de que se realice ningún tipo de actuación sobre ellas.
2. Las de tipo soto destinadas a fruto, con baja densidad de arbolado y con regeneración escasa o nula. El manejo es intensivo y muy heterogéneo en función del tipo de parcelación y propiedad que exista en esa zona. Se dan quemados, podas, clareos, roturaciones de suelo, encalado y uso de herbicidas.

Capítulo 2

Inventario de macromicetes epigeos en masas de *Castanea sativa* Mill. en el Bierzo

2.1. Introducción

Los hongos juegan un papel importante en la dinámica de los ecosistemas forestales terrestres a través de las relaciones tróficas que establecen con otras especies. Sin embargo, a pesar de su importancia funcional, sólo alrededor del 5-10% de las especies de hongos han sido descritas (Lonsdale et al. 2008) y a menudo se pasan por alto y se dejan fuera de las iniciativas de conservación (Zotti et al. 2013).

En la última década ha aumentado el interés por los hongos silvestres comestibles tanto como producto alimenticio como por el valor social, ambiental y económico que pueden aportar a las áreas rurales. Entre ellos, unas 200 especies son hongos ectomicorrízicos comestibles (EECMM) ampliamente consumidos en el hemisferio norte (Wang y Hall 2004). Boletos (*Boletus edulis* complejo de especies), rebozuelos (*Cantharellus cibarius* Fr.), níscalos (*Lactarius deliciosus* azafrán Fr.) y trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) son los principales hongos de comercialización y exportación en España (De Román y Boa 2004; Martínez-Peña et al. 2012).

En un área de 4,5 millones de hectáreas en la comunidad autónoma de Castilla y León, la producción anual promedio bruto de hongos silvestres comestibles de interés social y económico se ha estimado, excluido el género *Tuber*, en alrededor de 34 mil toneladas, teniendo un valor aproximado 80 millones de euros (Martínez-Peña et al. 2006-2010).

En la comarca del Bierzo (NO León) los castañares representan más del 50% de la superficie de *Castanea sativa* Mill. en Castilla y León, siendo uno de los recursos agroforestales más importantes de la comarca con reflejo en el paisaje, en los sistemas ecológicos y socioeconómicos (Fernández-Manso y Robles Llamazares 2009). La regresión de la especie en los últimos cincuenta años hace que cobre mayor importancia la introducción de nuevos usos como son la recolección de setas, que hasta el momento se lleva a cabo de forma individual y su escasa regulación dificulta la estimación de la relevancia económica.

El conocimiento acerca de la diversidad de hongos ectomicorrízicos (ECMM), su ecología, o gestión sostenible en bosques de castaños es escaso. En la bibliografía científica encontramos

estudios en Grecia (Diamandis y Perlerou 2001; Polemis et al. 2011), Rumanía (Chira y Chira 2003) y Portugal (Baptista et al. 2010; Martins et al. 2011).

El objetivo principal del inventario fue conocer los hongos ectomicorrícicos de los castaños del Bierzo como posible fuente de producción de inóculo para realizar los trabajos de micorrización de *Castanea sativa* en vivero.

Se intentó además contribuir al conocimiento de la biodiversidad de los hongos epigeos de los castaños del Bierzo, estudiar la abundancia relativa de especies micorrícicas frente a no micorrícicas y comestibles frente a no comestibles, como potencialidad de desarrollo económico de la zona.

2.2. Material y Métodos

Se prospectaron 13 localidades en las cuales se delimitaron zonas de muestreo de 1 hectárea de superficie: (1) Arnadelo, soto, (42.553, -6.90340; 802 m.a); (2) Berlanga del Bierzo, repoblación de 4 años (42.731, -6.5883; 828 m); (3) Burbia, soto (42.7972, -6.78416; 1120 m); (4) Bustarga, soto (42.7488, -6.7181; 920 m); (5) El Espino, soto (42.71861, -6.64527; 720 m); (6) Espanillo, soto (42.66972, -6.7; 547 m); (7) Las Médulas, monte bajo (42.455, -6.75694; 874 m); (8) Las Médulas, soto (42.45505, -6.75705; 834 m); (9) Médulas La Leitosa (Veguellina), monte bajo (42.695, -6.76861; 762 m); (10) Montes de Valdeusa, monte bajo (42.4452, -6.5714; 1000m); (11) Palacios de Compludo, soto (42.45, -6.4661; 1090 m); (12) Ribón, soto (42.932, -6.9681; 700 m) y (13) Tombrio de Arriba, soto (42.7105, -6.58916; 870 m).

El material fue recolectado durante cinco años de estudio (2001-2005) con salidas semanales durante los meses de mayor aparición de fructificaciones y cada dos semanas cuando se apreciaba parada de producción fúngica. Se recogieron carpóforos de las diferentes especies de macromicetes (mayor de 1 cm) epigeos de suelo y madera.

Los ejemplares en buen estado fueron fotografiados y herborizados para su depósito en el Herbario -Jaime Andrés Rodríguez -LEB- de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León.

Las muestras se identificaron sobre la base de sus características macro y microscópicas de acuerdo con las siguientes claves y monografías: Basso 1999; Bernicchia 2005; Bon 1988; Candusso y Lanzoni 1990; Courtecuisse y Duhem 1995; Ladurner y Simonini 2003; Muñoz 2005; Neville y Poumarat 2004; Noordelos 1992, 2004; Riva 1988; Sarnari 2004; Robich 2003. La clasificación taxonómica de las especies y la nomenclatura se basa en *Index Fungorum*

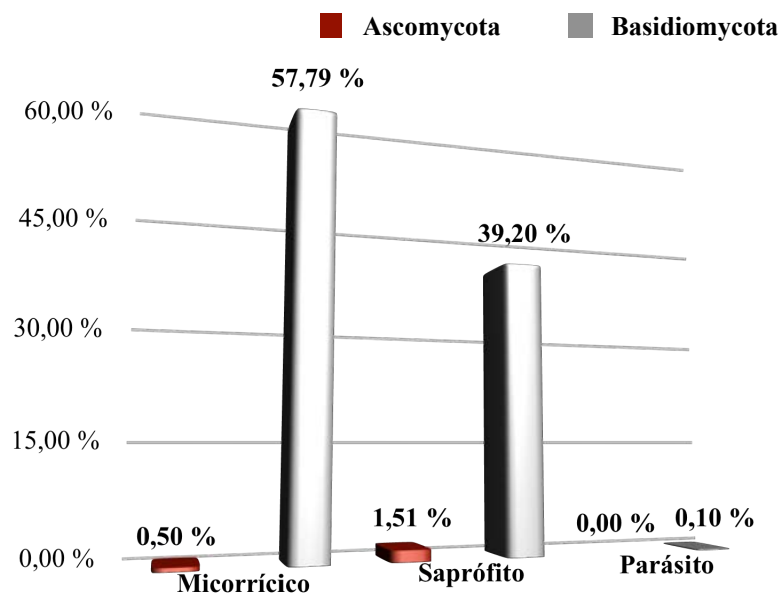
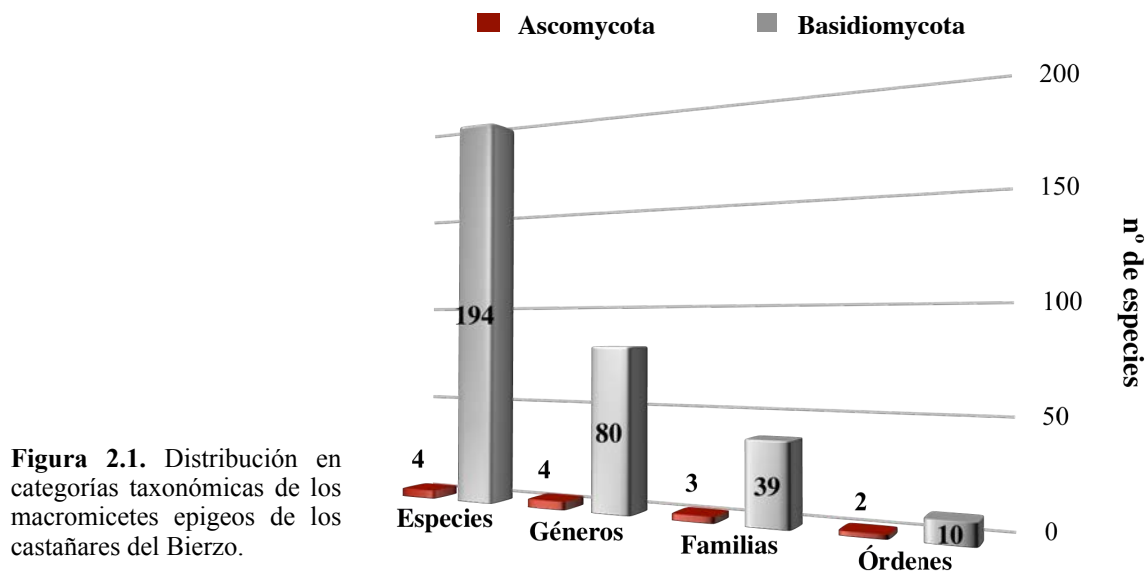
(<http://www.indexfungorum.org>). El catálogo resultante se ordena de forma alfabética por órdenes y familias dentro de los phyla correspondientes. En el caso de las especies que en los últimos años de investigación han sido modificadas de categoría específica o incluso de género se indica debajo del nombre válido actual el sinónimo con el que fue identificada. Las especies de dudosa identificación se indican con el símbolo #. La clasificación de grupos tróficos se basa en el trabajo de Tedersoo et al. 2010a y los datos de comestibilidad y comercialización se han tomado de De Román y Boa (2004) y Martínez-Peña et al. (2012).

2.3. Resultados

Durante el período de estudio, en las parcelas seleccionadas de *Castanea sativa* Mill., se recolectaron 198 especies de hongos macromicetes epigeos (Tabla 2.1) pertenecientes a 80 géneros incluidos en el phylum Basidiomycota (194 especies) y 4 géneros del phylum Ascomycota (4 especies) (Figura 2.1). El grupo trófico mayoritario es el de los hongos ectomicorrícicos con 115 especies (57,21% Basidiomycota, 0,50% Ascomycota), frente a saprófitos con 81 especies (39,30% Basidiomycota, 1,99% Ascomycota) y parásitos con 2 especies (1% Basidiomycota). Se encontró puntualmente la especie *Onticium romelii* (S. Lundell) Parmastoque al no estar dentro de los dos phyla principales se ha dejado fuera de la valoración de los datos (Figura 2.2).

Los géneros ectomicorrícicos con mayor número de especies fueron *Amanita*, grupo *Boletus*, *Cortinarius*, *Lactarius* y *Russula* (Figura 2.3). En cuanto a los saprófitos los géneros con mayor riqueza específica son *Agaricus*, *Clitocybe*, *Entoloma*, *Lycoperdon*, *Mycena* y *Psathyrella* (Figura 2.4.)

En cuanto a comestibilidad, siguiendo sólo las referencias indicadas en los trabajos de De Román y Boa (2004) y Martínez-Peña et al. (2012) encontramos un total de 24 especies comestibles de las cuales 17 son micorrizógenas, 5 son saprófitas y 2 son parásitas (Figura 2.3 y 2.4). Aunque a nivel global la representación de hongos micorrizógenas comestibles no es elevada, sólo el 8%, algunas de las especies presentes son comercializadas con elevado valor económico: *Amanita caesarea*, grupo *Boletus*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Craterellus tubaeformis*, *Hydnum repandum* e *Hydnum rufescens* (Figura 2.5).



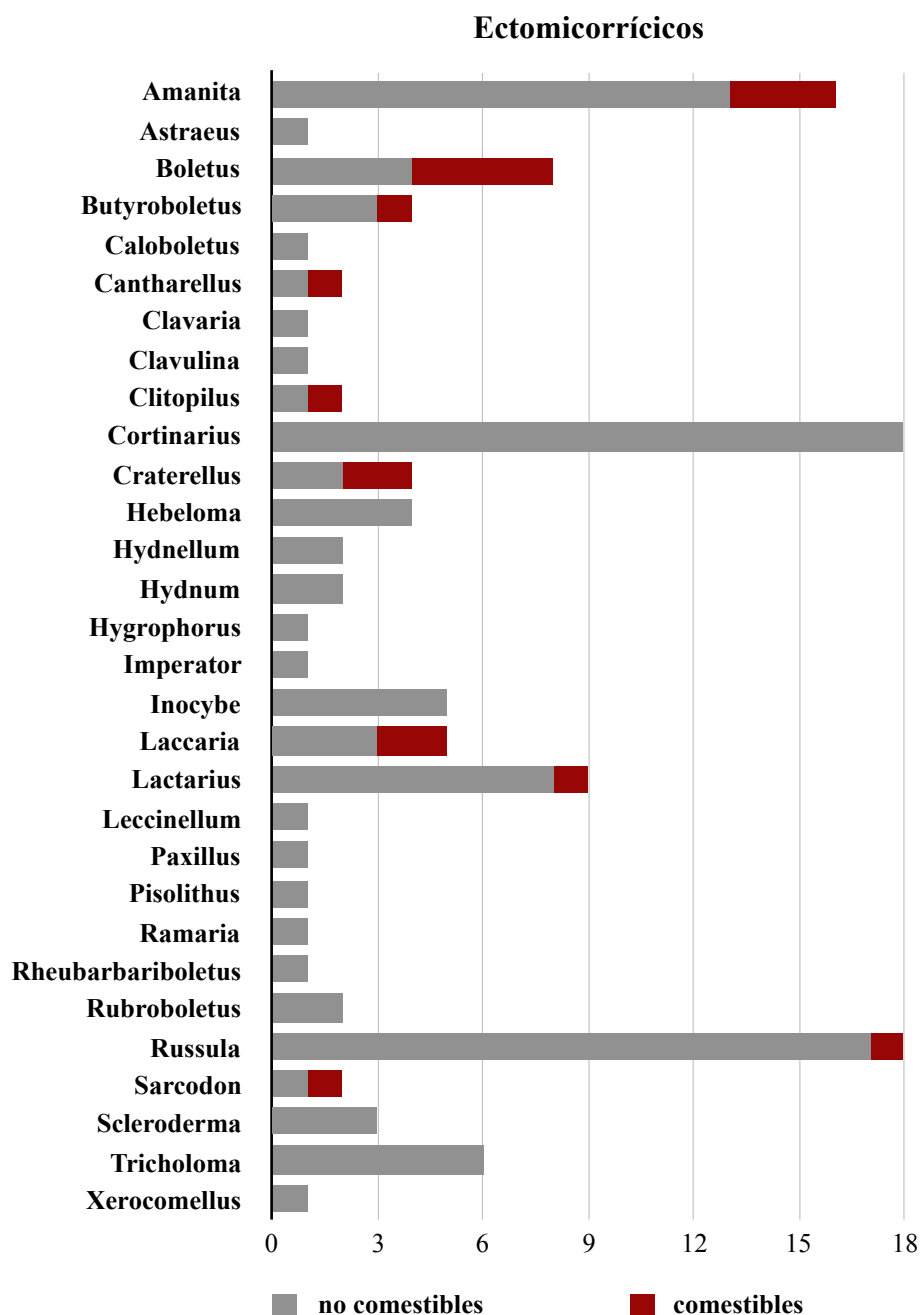


Figura 2.3. Macromicetes ectomicorrícicos epigeos de los castaños. Abundancia de especies por géneros y comestibilidad.

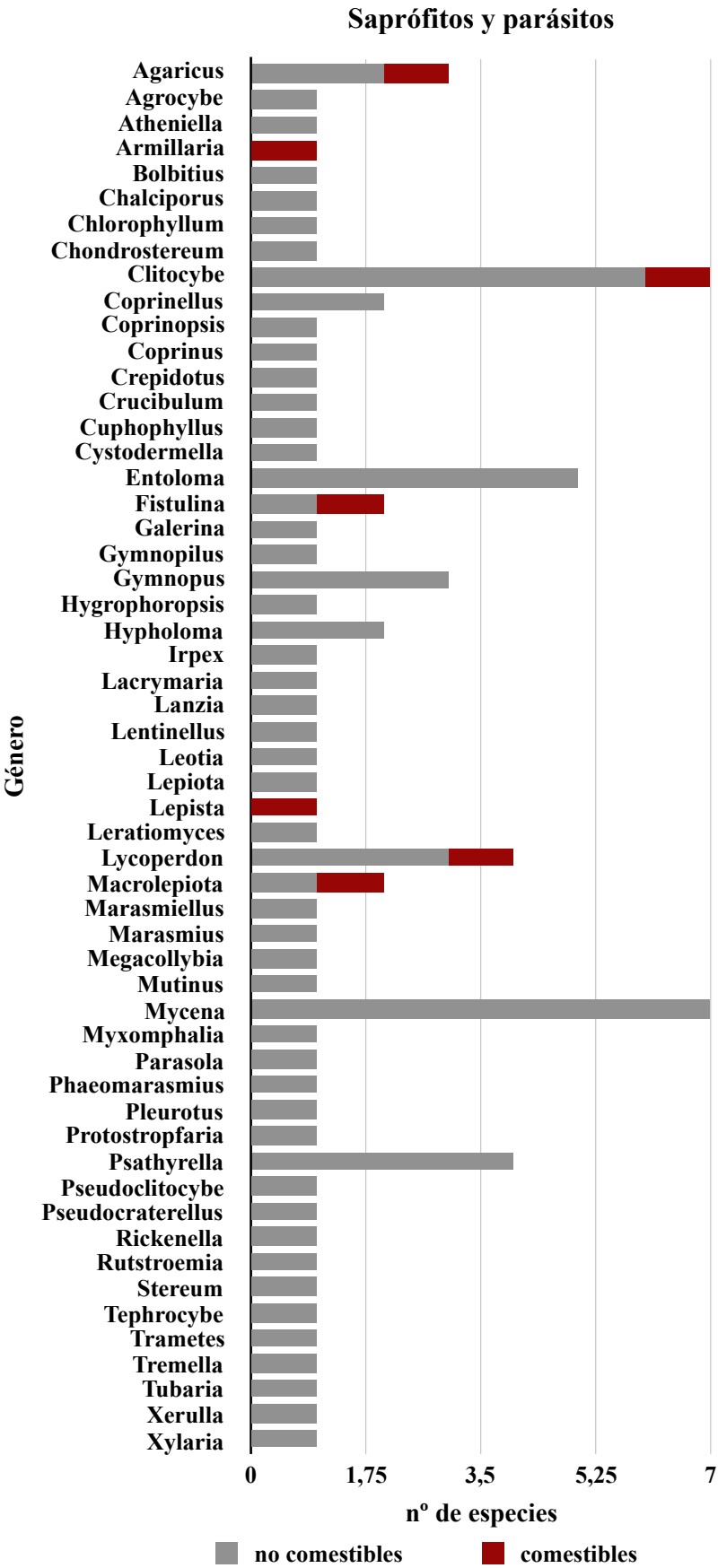


Figura 2.4. Macromicetes saprófitos y parásitos epigeos de los castaños. Abundancia de especies por géneros y comestibilidad.

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrízico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
ASCOMYCOTA	
HELOTIALES	
<i>Leotiaceae</i>	
Leotia lubrica (Scop.) Pers., <i>Comm. fung. clav.</i> (Lipsiae): 31 (1797)	mico
<i>Rutstroemiaceae</i>	
Lanzia echinophila (Bull.) Korf, <i>Mycotaxon</i> 14 (1): 1 (1982) * <i>Rutstroemia echinophila</i> (Bull.) Höhn.	sapro
Rutstroemia firma (Pers.) P. Karst., <i>Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk</i> 19 : 108 (1871)	sapro
XYLARIACEAE	
<i>Xylariales</i>	
Xylaria hypoxylon (L.) Grev., <i>Fl. Edin.</i> : 355 (1824)	sapro
BASIDIOMYCOTA	
AGARICALES	
<i>Agaricaceae</i>	
Agaricus arvensis Schaeff., <i>Fung. bavar. palat. nasc. (Ratisbonae)</i> 4 : 310 (1774)	sapro
Agaricus comtulus Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 215 (1838) [1836-1838]	sapro
Agaricus xanthodermus Genev., <i>Bull. Soc. bot. Fr.</i> 23 : 28 (1876)	sapro
Chlorophyllum rachodes (Vittad.) Vellinga, <i>Mycotaxon</i> 83 : 416 (2002) * <i>Macrolepiota rachodes</i> (Vittad.) Singer	sapro
Coprinus comatus (O.F. Müll.) Pers. <i>Tent. disp. meth. fung.</i> (Lipsiae): 62 (1797)	sapro
Crucibulum laeve (Huds.) Kambly, <i>Gast. Iowa</i> : 167 (1936)	sapro
Cystodermella cinnabarina (Alb. & Schwein.) Harmaja, <i>Karstenia</i> 42 (2): 45 (2002) * <i>Cystoderma cinnabarinum</i> (Alb. & Schwein.) Fayod	sapro
Lepiota clypeolaria (Bull.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 137 (1871)	sapro
Lycoperdon molle Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 1 : 150 (1801)	sapro
Lycoperdon nigrescens (Pers.) Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 1 : 146 (1801)	sapro
Lycoperdon perlatum Pers., <i>Observ. mycol.</i> (Lipsiae) 1 : 4 (1796)	sapro
Lycoperdon utriforme Bull., <i>Hist. Champ. Fr.</i> (Paris): 153 (1791) * <i>Calvatia utriformis</i> (Bull.) Jaap	sapro

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Macrolepiota mastoidea (Fr.) Singer, <i>Lilloa</i> 22 : 417 (1951) [1949] * <i>M. affinis</i> (Velen.) Bon	sapro
Macrolepiota procera (Scop.) Singer, <i>Pap. Mich. Acad. Sci.</i> 32 : 141 (1948) [1946]	sapro
<i>Amanitaceae</i>	
Amanita argentea Huijsman, <i>Bull. trimest. Soc. mycol. Fr.</i> 75 (1): 14 (1959)	mico
Amanita battarrae (Boud.) Bon, <i>Docums Mycol.</i> 16 (no. 61): 16 (1985) * <i>A. umbrinolutea</i> (Secr. ex Gillet) Bataille 1910	mico
Amanita caesarea (Scop.) Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 2 : 252 (1801)	mico
Amanita citrina Pers. f. alba (Pers.) Quél., <i>Compt. Rend. Assoc. Franç. Avancem. Sci.</i> 20 (2): 467 (1892) [1891]	mico
Amanita echinocephala (Vittad.) Quél., <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard</i> , Sér. 2 5 : 321 (1872)	mico
Amanita excelsa (Fr.) Bertill., in Dechambre, <i>Dict. Encyclop. Sci. Médic.</i> (Paris) 1 (3): 499 (1866) * <i>A. excelsa</i> var. <i>spissa</i> (Fr.) Neville & Poumarat	mico
Amanita franchetii (Boud.) Fayod, <i>Annls Sci. Nat., Bot.</i> , sér. 7 9 : 316 (1889)	mico
Amanita gemmata (Fr.) Bertill., <i>Dict. Encyclop. Sci. Médic.</i> (Paris) 1 (3): 496 (1866) * <i>A. junquillea</i> Quél.	mico
Amanita muscaria (L.) Lam., <i>Encycl. Méth. Bot.</i> (Paris) 1 (1): 111 (1783)	mico
#Amanita pachyvolvata (Bon) Krieglst., <i>Beih. Z. Mykol.</i> 5 (2): 191 (1984)	mico
Amanita pantherina (DC.) Krombh., <i>Naturgetr. Abbild. Beschr. Schwämme</i> (Prague): 29 (1846)	mico
Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Link, <i>Handbuck zur Erkennung der Nutzbarsten und am Häufigsten Vorkommenden Gewächse</i> 3 : 272 (1833)	mico
Amanita rubescens Pers., <i>Tent. disp. meth. fung.</i> (Lipsiae): 71 (1797)	mico
#Amanita strobiliformis (Paulet ex Vittad.) Bertill., <i>Dict. Encyclop. Sci. Médic.</i> (Paris) 1 (3): 499 (1866)	mico
Amanita subnudipes (Romagn.) Tulloss, 2000, <i>Mycotaxon</i> 75 : 329 (2000) * <i>A. crocea</i> var. <i>subnudipes</i> Romagn.	mico
Amanita vaginata (Bull.) Lam., <i>Encycl. Méth. Bot.</i> (Paris) 1 (1): 109 (1783)	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
<i>Bolbitiaceae</i>	
Bolbitius titubans (Bull.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 254 (1838) [1836-1838]	sapro
<i>Clavariaceae</i>	
#Clavaria zollingeri Lév., <i>Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3</i> 5 : 155 (1846)	mico
<i>Cortinariaceae</i>	
Cortinarius alboviolaceus (Pers.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 280 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius amoenolens Rob. Henry ex P.D. Orton, <i>Trans. Br. mycol. Soc.</i> 43 (2): 206 (1960)	mico
Cortinarius anomalus (Fr.: Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 286 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius balteatocumatilis Rob. Henry ex P.D. Orton, <i>Trans. Br. mycol. Soc.</i> 43 (2): 207 (1960)	mico
Cortinarius camphoratus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 280 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius caperatus (Pers.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 256 (1838) [1836-1838] * <i>Rozites caperatus</i> (Pers.) P. Karst.	mico
Cortinarius causticus Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 270 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius cinnabarinus Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 287 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius diabolicus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 285 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius livido-ochraceus (Berk.) Berk., <i>Outl. Brit. Fung.</i> (London): 186 (1860)	mico
#Cortinarius elegantissimus Rob. Henry, <i>Docums Mycol.</i> 20 (no. 77): 69 (1989)	mico
Cortinarius glaucopus (Schaeff.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 264 (1838) [1836-1838]	mico
#Cortinarius infractus (Pers.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 261 (1838) [1836-1838]	mico
#Cortinarius odoratus (Joguet ex M.M. Moser) M.M. Moser, in Gams, <i>Kl. Krypt.-Fl.</i> , Edn 3 (Stuttgart) 2b/2 : 306 (1967)	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Cortinarius olidus J.E. Lange, <i>Fl. Agaric. Danic.</i> 5 (Taxon. Consp.): III (1940)	mico
Cortinarius, meinhardii Bon, <i>Docums Mycol.</i> 16 (nos 63-64): 66 (1986) * <i>C. splendens</i> Rob. Henry	mico
Cortinarius stillatitius Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 277 (1838) [1836-1838]	mico
Cortinarius trivialis J.E. Lange, <i>Fl. Agaric. Danic.</i> 5 (Taxon. Consp.): III (1940)	mico
Galerina pumila (Pers.) M. Lange, <i>Persoonia</i> 2 (1): 41 (1961)	sapro
Hebeloma anthracophilum Maire, <i>Bull. Soc. mycol. Fr.</i> 26 : tab. 7 (1910)	mico
Hebeloma crustuliniforme (Bull.) Quél., <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard</i> , Sér. 2 5 : 128 (1872)	mico
Hebeloma radicosum (Bull.) Ricken, <i>Die Blätterpilze</i> : 115 (1911)	mico
Hebeloma sinapizans (Paulet) Gillet, <i>Hyménomycètes</i> (Alençon): 527 (1876) [1878]	mico
<i>Cyphellaceae</i>	
Chondrostereum purpureum (Pers.) Pouzar, <i>Česká Mykol.</i> 13 (1): 17 (1959)	sapro
<i>Entolomataceae</i>	
Clitopilus prunulus (Scop.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 96 (1871)	mico
Entoloma hirtipes M.M. Moser in Gams, <i>Kl. Krypt.-Fl.</i> , Bd II b/2, ed. 4 (Stuttgart) 2b/2 : 206 (1978)	sapro
Entoloma lividoalbum (Kühner & Romagn.) Kubička, <i>Česká Mykol.</i> 9 : 27 (1975)	mico
Entoloma excentricum Bres., <i>Fung. trident.</i> 1 (1): 11 (1881)	sapro
Entoloma rhodopolium (Fr.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 98 (1871)	mico
Entoloma sericeum Quél. <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard</i> , Sér. 2 5 : 119 (1872)	sapro
<i>Fistulinaceae</i>	
Fistulina hepatica (Schaeff.) With. <i>Syst. arr. Brit. pl.</i> , Edn 4 (London) 4 : 302 (1801)	paras
<i>Hydnangiaceae</i>	
Laccaria amethystina Cooke, <i>Grevillea</i> 12 (no. 63): 70 (1884)	mico
Laccaria bicolor (Maire) P.D. Orton, <i>Trans. Br. mycol. Soc.</i> 43 (2): 280 (1960)	mico
Laccaria laccata (Scop.) Cooke, <i>Grevillea</i> 12 (no. 63): 70 (1884)	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
<i>Hygrophoraceae</i>	
Cuphophyllus virgineus (Wulfen) Kovalenko, in <i>Nezdoīminogo, Opredelitel' Gribov SSSR</i> (Leningrad): 37 (1989) * <i>Hygrocybe virginea</i> (Wulfen) P.D. Orton & Watling	sapro
Hygrophorus nemoreus (Pers.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 326 (1838) [1836-1838]	mico
<i>Inocybaceae</i>	
Crepidotus variabilis (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 74 (1871)	sapro
Inocybe cookei Bres., <i>Fung. trident.</i> 2(8-10): 17 (1892)	mico
Inocybe dulcamara (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 79 (1871)	mico
Inocybe erubescens A. Blytt, <i>Skr. VidenskSelsk. Christiania</i> , Kl. I, Math.-Natur.(no. 6): 54 (1905) [1904]	mico
Inocybe geophylla (Bull.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 78 (1871)	mico
Inocybe rimosa (Bull.: Fr.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 78 (1871)	mico
Phaeomarasmium erinaceus (Fr.) Scherff. ex Romagn., <i>Revue Mycol.</i> , Paris 2(5): 195 (1937)	sapro
<i>Lyophyllaceae</i>	
Tephrocybe rancida (Fr.) Donk in Grilli, <i>Nova Hedwigia</i> , Beih. 5: 284 (1962)	sapro
<i>Marasmiaceae</i>	
Atheniella flavoalba (Fr.) Redhead, Moncalvo, Vilgalys, Desjardin & B.A. Perry, <i>Index Fungorum</i> 14: 1 (2012) * <i>Mycena flavoalba</i> (Fr.) Quél.	sapro
Marasmius epiphyllus (Pers.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 386 (1838) [1836-1838]	sapro
Megacollybia platyphylla (Pers.) Kotl. & Pouzar, <i>Česká Mykol.</i> 26: 220 (1972)	sapro
<i>Mycenaceae</i>	
Mycena epipterygia (Scop.) Gray, <i>Nat. Arr. Brit. Pl.</i> (London) 1: 619 (1821)	sapro
Mycena galericulata (Scop.) Gray, <i>Nat. Arr. Brit. Pl.</i> (London) 1: 619 (1821)	sapro
Mycena inclinata (Fr.) Quél., <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard</i> , Sér. 2 5: 105 (1872)	sapro
Mycena meliigena (Berk. & Cooke) Sacc., <i>Syll. fung.</i> (Abellini) 5: 302 (1887)	sapro
Mycena polygramma (Bull.) Gray, <i>Nat. Arr. Brit. Pl.</i> (London) 1: 619 (1821)	sapro

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Mycena pura (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 107 (1871)	sapro
Mycena vitilis (Fr.) Quél., <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard</i> , Sér. 2 5 : 106 (1872)	sapro
<i>Omphalotaceae</i>	
Gymnopus dryophilus (Bull.) Murrill, <i>N. Amer. Fl. (New York)</i> 9 (5): 362 (1916) * <i>Collybia dryophila</i> (Bull.) P. Kumm.	sapro
Gymnopus fusipes (Bull.) Gray, <i>Nat. Arr. Brit. Pl.</i> (London) 1 : 604 (1821) * <i>Collybia fusipes</i> (Bull.) Quél.	sapro
Gymnopus kuehneriana (Pers.) Antonín, Halling & Noordel., <i>Mycotaxon</i> 63 : 364 (1997) * <i>Collybia kuehneriana</i> Singer	sapro
Marasmiellus ramealis (Bull.) Singer, <i>Pap. Mich. Acad. Sci.</i> 32 : 130 (1948) [1946]	sapro
<i>Physalacriaceae</i>	
Armillaria mellea (Vahl) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 134 (1871)	paras
Xerula pudens (Pers.) Singer, <i>Lilloa</i> 22 : 289 (1951) [1949] * <i>Oudemansiella longipes</i> (P. Kumm.) Boursier	sapro
<i>Pleurotaceae</i>	
Pleurotus dryinus (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 101 (1871)	sapro
<i>Psathyrellaceae</i>	
Coprinellus impatiens (Fr.) J.E. Lange, <i>Dansk bot. Ark.</i> 9 (no. 6): 93 (1938) * <i>Coprinus impatiens</i> (Fr.) Quél.	sapro
Coprinellus micaceus (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson, in Redhead, Vilgalys, Moncalvo, Johnson & Hopple, <i>Taxon</i> 50 (1): 234 (2001) * <i>Coprinus micaceus</i> (Bull.) Fr.	sapro
Coprinopsis picacea (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo, in Redhead, Vilgalys, Moncalvo, Johnson & Hopple, <i>Taxon</i> 50 (1): 234 (2001) * <i>Coprinus picaceus</i> (Bull.) Gray	sapro
Lacrymaria lacrymabunda (Bull.) Pat., <i>Hyménomyc. Eur.</i> (Paris): 123 (1887)	sapro
Parasola leiocephala (P.D. Orton) Redhead, Vilgalys & Hopple, in Redhead, Vilgalys, Moncalvo, Johnson & Hopple, <i>Taxon</i> 50 (1): 236 (2001) * <i>Coprinus leiocephalus</i> P.D. Orton	sapro
Psathyrella bipellis (Quél.) A.H. Sm., <i>J. Elisha Mitchell scient. Soc.</i> 62 : 187 (1946)	sapro

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrízico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
<i>Psathyrella lutensis</i> (Romagn.) Bon, <i>Docums Mycol.</i> 12 (no. 48): 52 (1983) [1982]	sapro
# <i>Psathyrella prona</i> (Fr.) Gillet, <i>Hyménomycètes</i> (Alençon): 618 (1878)	sapro
<i>Psathyrella piluliformis</i> (Bull.) P.D. Orton, <i>Notes R. bot. Gdn Edinb.</i> 29 : 116 (1969)	sapro
<i>Strophariaceae</i>	
<i>Agrocybe praecox</i> (Pers.) Fayod, <i>Annls Sci. Nat., Bot., sér. 7</i> 9 : 358 (1889)	sapro
# <i>Gymnopilus penetrans</i> (Fr.) Murrill, <i>Mycologia</i> 4 (5): 254 (1912)	sapro
<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 72 (1871)	sapro
<i>Hypholoma lateritium</i> (Schaeff.), P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 72 (1871)	sapro
<i>Leratiomyces squamosus</i> (Pers.) Bridge & Spooner, <i>Mycotaxon</i> 103 : 117 (2008)	sapro
* <i>Stropharia squamosa</i> (Pers.) Quél.	sapro
<i>Protostropharia semiglobata</i> (Batsch) Redhead, Moncalvo & Vilgalys in Redhead, <i>Index Fungorum</i> 15 : 2 (2013)	sapro
* <i>Stropharia semiglobata</i> (Batsch) Quél.	sapro
<i>Tricholomataceae</i>	
<i>Clitocybe costata</i> Kühner & Romagn., <i>Bull. Soc. nat. Oyonnax</i> 8 : 73 (1954)	sapro
<i>Clitocybe dealbata</i> (Sowerby) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 121 (1871)	sapro
<i>Clitocybe fragrans</i> (With.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 121 (1871)	sapro
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 123 (1871)	sapro
<i>Clitocybe nebularis</i> (Batsch) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 124 (1871)	sapro
<i>Clitocybe odora</i> (Bull.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 121 (1871)	sapro
<i>Clitocybe phyllophila</i> (Pers.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 122 (1871)	sapro
<i>Lepista flaccida</i> (Sowerby) Pat., <i>Hyménomyc. Eur.</i> (Paris): 96 (1887)	sapro
* <i>Lepista inversa</i> (Scop.) Pat.	sapro
<i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke, <i>Handb. Brit. Fungi</i> 1 : 192 (1871)	sapro
<i>Myxomphalia maura</i> (Fr.) Hora, <i>Trans. Br. mycol. Soc.</i> 43 (2): 453 (1960)	sapro
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i> (Bull.) Singer, <i>Mycologia</i> 48 (5): 725 (1956)	sapro
<i>Tricholoma acerbum</i> (Bull.) Quél., <i>Mém. Soc. Émul. Montbéliard, Sér. 2</i> 5 : 77 (1872)	mico
<i>Tricholoma saponaceum</i> (Fr.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 133 (1871)	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Tricholoma sulphureum (Bull.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 133 (1871)	mico
Tricholoma ustale (Fr.) P. Kumm., <i>Führ. Pilzk.</i> (Zerbst): 130 (1871)	mico
Tricholoma ustaloides Romagn., in Kühner & Romagnesi, <i>Bull. Soc. nat. Oyonnax</i> 8 : 76 (1954)	mico
Tricholoma viridifucatum Bon, <i>Docums Mycol.</i> 6 (nos 22-23): 185 (1976)	mico
<i>Tubariaceae</i>	
Tubaria furfuracea (Pers.) Gillet, <i>Hyménomycètes</i> (Alençon): 537 (1876) [1878]	sapro
BOLETALES	
<i>Boletaceae</i>	
Boletus aereus Bull., <i>Herb. Fr.</i> 9 : tab. 385 (1789)	mico
Boletus edulis Bull., <i>Herb. Fr.</i> 2 : tab. 60 (1782) [1781-82]	mico
Boletus erythropus Pers., <i>Observ. mycol.</i> (Lipsiae) 1 : 23 (1796)	mico
Boletus ferrugineus Schaeff., <i>Fung. bavar. palat. nasc.</i> (Ratisbonae) 4 : 85 (1774) * <i>Xerocomus ferrugineus</i> (Schaeff.) Alessio	mico
Boletus pinophilus Pilát & Dermek, <i>Česká Mykol.</i> 27 (1): 6 (1973)	mico
Boletus reticulatus Schaeff., <i>Fung. bavar. palat. nasc.</i> (Ratisbonae) 4 : 78 (1774)	mico
Boletus spretus Bertéa, <i>Docums Mycol.</i> 18 (no. 72): 62 (1988) * <i>Boletus aemilii</i> Barbier	mico
Boletus subtomentosus L., <i>Sp. pl.</i> 2 : 1178 (1753) * <i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Quél.	mico
Butyriboletus appendiculatus (Schaeff.) D. Arora & J.L. Frank, <i>Mycologia</i> 106 (3): 466 (2014) * <i>Boletus appendiculatus</i> Schaeff.	mico
Butyriboletus pseudoregius (Heinr. Huber) D. Arora & J.L. Frank, <i>Mycologia</i> 106 (3): 466 (2014) * <i>Boletus pseudoregius</i> (Heinr. Huber) Estadès	mico
Butyriboletus regius (Krombh.) D. Arora & J.L. Frank, <i>Mycologia</i> 106 (3): 466 (2014) * <i>Boletus regius</i> Krombh.	mico
Caloboletus radicans (Pers.) Vizzini, <i>Index Fungorum</i> 146 : 1 (2014) * <i>Boletus radicans</i> Pers.	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Chalciporus piperatus (Bull.) Bataille, <i>Bull. Soc. Hist. nat. Doubs</i> 15 : 39 (1908)	
Imperator rhodopurpureus (Smotl.) Assyov, Bellanger, Bertéa, Courtec., Koller, Loizides, G. Marques, J.A. Muñoz, N. Oppicelli, D. Puddu, F. Rich. & P.-A. Moreau, <i>Index Fungorum</i> 243 : 1 (2015) * <i>Boletus rhodopurpureus</i> Smotl.	mico
Leccinellum crocipodium (Letell.) Della Maggiora & Trassinelli, <i>Index Fungorum</i> 171 : 1 (2014) * <i>Leccinum crocipodium</i> (Letell.) Watling	mico
Rheubarbaribolus armeniacus (Quél.) Vizzini, Simonini & Gelardi, in Vizzini, <i>Index Fungorum</i> 244 : 1 (2015) * <i>Xerocomus armeniacus</i> (Quél.) Quél.	mico
Rubroboletus rhodoxanthus (Krombh.) Kuan Zhao & Zhu L. Yang, <i>Phytotaxa</i> 188 (2): 70 (2014) * <i>Boletus rhodoxanthus</i> (Krombh.) Kallenb.	mico
Rubroboletus satanas (Lenz) Kuan Zhao & Zhu L. Yang, <i>Phytotaxa</i> 188 (2): 70 (2014) * <i>Boletus satanas</i> Lenz	mico
Xerocomellus chrysenteron (Bull.) Šutara, <i>Czech Mycol.</i> 60 (1): 49 (2008) * <i>Xerocomus chrysenteron</i> (Bull.) Quél.	mico
Diplocystidiaceae	
Astraeus hygrometricus (Pers.) Morgan, <i>J. Cincinnati Soc. Nat. Hist.</i> 12 : 20 (1889)	mico
Hygrophoropsidaceae	
Hygrophoropsis aurantiaca (Wulfen) Maire, <i>L'Empoisonnem. Champ.</i> : 99 (1921)	sapro
Paxillaceae	
Paxillus involutus (Batsch) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 317 (1838) [1836-1838]	mico
Sclerodermataceae	
Scleroderma citrinum Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 1 : 153 (1801)	mico
Scleroderma polyrhizum (J.F. Gmel.) Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 1 : 156 (1801)	mico
Scleroderma verrucosum (Bull.) Pers., <i>Syn. meth. fung.</i> (Göttingen) 1 : 154 (1801)	mico
Pisolithus arhizus (Scop.) Rauschert, <i>Z. Pilzk.</i> 25 (2): 50 (1959)	mico

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
CANTHARELLALES	
<i>Cantharellaceae</i>	
Cantharellus cibarius Fr., <i>Syst. mycol.</i> (Lundae) 1 : 318 (1821)	mico
Craterellus cornucopioides (L.) Pers., <i>Mycol. eur.</i> (Erlanga) 2 : 5 (1825)	mico
Craterellus tubaeformis (Fr.) Quél., <i>Fl. mycol. France</i> (Paris): 36 (1888)	mico
Pseudocraterellus undulatus (Pers.) Rauschert, <i>Feddes Repert. Spec. Nov. Regni Veg.</i> 98 (11-12): 661 (1987)	
* <i>Pseudocraterellus sinuosus</i> (Fr.) Corner	
<i>Clavulinaceae</i>	
Clavulina rugosa (Bull.) J. Schröt., in Cohn, <i>Krypt.-Fl. Schlesien</i> (Breslau) 3.1 (25–32): 442 (1888) [1889]	mico
<i>Hydnaceae</i>	
Hydnum repandum L., <i>Sp. pl.</i> 2 : 1178 (1753)	mico
Hydnum rufescens Pers., <i>Observ. mycol.</i> (Lipsiae) 2 : 95 (1800) [1799]	mico
GOMPHALES	
<i>Gomphaceae</i>	
Ramaria formosa (Pers.) Quél., <i>Fl. mycol. France</i> (Paris): 466 (1888)	mico
HYMENOCHAETALES	
<i>Rickenellaceae</i>	
Rickenella fibula (Bull.) Raithelh., <i>Metrodiana</i> 4 : 67 (1973)	sapro
PHALLALES	
<i>Phallaceae</i>	
Mutinus caninus (Huds.) Fr., <i>Summa veg. Scand.</i> , Section Post. (Stockholm): 434 (1849)	sapro
POLYPORALES	
<i>Meruliaceae</i>	
Irpex lacteus (Fr.) Fr., <i>Elench. fung.</i> (Greifswald) 1 : 142 (1828)	sapro
<i>Polyporaceae</i>	
Trametes versicolor (L.) Lloyd, <i>Mycol. Notes</i> (Cincinnati) 65 : 1045 (1921) [1920]	sapro

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
RUSSULALES	
<i>Auriscalpiaceae</i>	
Lentinellus micheneri (Berk. & M.A. Curtis) Pegler, <i>Kew Bull.</i> , Addit. Ser. 10 : 245 (1983)	sapro
<i>Russulaceae</i>	
Lactarius aurantiacus (Pers.) Gray, <i>Nat. Arr. Brit. Pl.</i> (London) 1 : 624 (1821)	mico
Lactarius camphoratus (Bull.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 346 (1838) [1836-1838]	mico
Lactarius chrysorrheus Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 342 (1838) [1836-1838]	mico
#Lactarius fuliginosus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 348 (1838) [1836-1838]	mico
Lactarius piperatus (L.) Pers., <i>Tent. disp. meth. fung.</i> (Lipsiae): 64 (1797)	mico
Lactarius quietus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 343 (1838) [1836-1838]	mico
Lactarius uvidus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 338 (1838) [1836-1838]	mico
Lactarius vellereus (Fr.) Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 340 (1838) [1836-1838]	mico
Russula albonigra (Krombh.) Fr., <i>Hymenomyc. eur.</i> (Upsaliae): 440 (1874)	mico
Russula amoena Quél., <i>Compt. Rend. Assoc. Franç. Avancem. Sci.</i> 9 : 668 (1881) [1880]	mico
#Russula aurora Bres., <i>Fung. trident.</i> 2 : 93 (1892)	mico
*Russula velutipes Velen.	
Russula cyanoxantha (Schaeff.) Fr., <i>Monogr. Hymenomyc. Suec.</i> (Upsaliae) 2 (2): 194 (1863)	mico
Russula delica Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 350 (1838) [1836-1838]	mico
Russula foetens Pers, <i>Observ. mycol.</i> (Lipsiae) 1 : 102 (1796)	mico
Russula fragilis Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 359 (1838) [1836-1838]	mico
Russula atropurpurea (Krombh.) Britzelmayer, <i>Rep. (Annual) Trustees State Mus. Nat. Hist., New York</i> 41 : 75 (1888)	mico
Russula grata Britzelm., <i>Ber. naturhist. Augsburg</i> 9 : 239 (1898)	mico
*Russula laurocerasi Melzer	

Tabla 2.1. Macromicetes epigeos de los castaños. Grupos tróficos.* Sinónimo con el que fue determinado. # Requiere confirmación. Sapr =saprófito; mico=micorrícico; paras=parásito.

TAXON	GRUPO TROFICO
Russula nigricans Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 350 (1838) [1836-1838]	mico
Russula pectinatoides Peck, <i>Bull. N.Y. St. Mus.</i> 116 : 43 (1907)	mico
Russula puellaris Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 362 (1838) [1836-1838]	mico
Russula risigallina (Batsch) Sacc., <i>Fl. ital. crypt.</i> , Hymeniales (Genoa) 1 : 430 (1915)	mico
Russula sororia Fr., <i>Epicr. syst. mycol.</i> (Upsaliae): 359 (1838) [1836-1838]	mico
Russula vesca Fr., <i>Anteckn. Sver. Ätl. Svamp.</i> : 51 (1836)	mico
Russula virescens (Schaeff.) Fr., <i>Anteckn. Sver. Ätl. Svamp.</i> : 50 (1836)	mico
Stereaceae	
Stereum hirsutum (Willd.) Pers., <i>Observ. mycol.</i> (Lipsiae) 2 : 90 (1800) [1799]	sapro/paras
THELEPHORALES	
Bankeraceae	
Hydnellum auratile (Britzelm.) Maas Geest., <i>Persoonia</i> 1 (1): 111 (1959)	mico
Hydnellum conrescens (Pers.) Banker, <i>Mem. Torrey bot. Club</i> 12 : 157 (1906)	mico
Sarcodon imbricatus (L.) P. Karst., <i>Revue mycol.</i> , Toulouse 3 (no. 9): 20 (1881)	mico
TREMELLALES	
Tremellaceae	
Tremella mesenterica Retz., <i>K. svenska Vetensk-Akad. Handl.</i> 30 : 249 (1769)	sapro
Incertae sedis	
Odonticium romellii (S. Lundell) Parmasto, <i>Consp. System. Corticiac.</i> (Tartu): 126 (1968)	sapro



Figura 2.5. Algunos hongos comestibles de los castañares del Bierzo: **a)** *Amanita caesarea*; **b)** *Boletus* grupo *edulis*; **c)** *Craterellus tubaeformis*; **d)** *Craterellus cornucopioides*; **e)** *Butyriboletus pseudoregius*; **f)** *Butyriboletus regius*; **g)** *Hydnum repandum*; **h)** *Russula cyanoxantha*; **i)** *Clitopilus prunulus*; **j)** *Agaricus arvensis*; **k)** *Clitocybe nebularis*; **l)** *Coprinus comatus*; **m)** *Lepista nuda*; **n)** *Armillaria mellea*; **ñ)** *Fistulina hepatica*.

2.4. Discusión

La elevada diversidad de macromicetes asociados a las masas de *Castanea sativa* en el Bierzo (198 especies) es mayor que en estudios previos para el sur de Italia (153 especies; Laganà et al. 2002), Grecia (168 especies; Diamandis y Perlerou 2001), Rumanía (25 especies; Chira y Chira 2003) y noreste de Portugal (73 especies; Baptista et al. 2010). Esto puede ser debido a diferentes factores: diferencias en el método de muestreo, variabilidad de edad y densidad de arbolado, composición de la comunidad, suelo y condiciones climáticas (Smith et al. 2002; Ferris et al. 2000; Conn y Dighton 2000; Baptista et al. 2010).

Los hongos ectomicorrícicos que hemos catalogado asociados a *C. sativa* en el Bierzo pertenecen a géneros que no proporcionan una buena fuente de inóculo esporal (*Boletus* spp., *Amanita* sp., *Tricholoma* spp...), por lo que para trabajar en un programa de micorrización en vivero es necesario su cultivo y multiplicación en cultivo in vitro. El grupo que mejor crece en cultivo in vitro y con posibilidad de obtención de micelio para inoculaciones es el de *Boletus* spp., pero a día de hoy la producción de planta micorrizada en condiciones de vivero con estas especies no es viable (datos no presentados). Fue necesario por tanto para los capítulos de obtención de planta micorrizada de *C. sativa* en vivero, buscar fuentes de inóculo externas al encontrado en su ambiente natural.

Debido a que el objetivo de este trabajo fue la obtención de material para ser utilizado como fuente de inóculo y no estudiar la biodiversidad de los hongos de los castaños somos conscientes que la riqueza fúngica ha sido infravalorada por dos causas. La primera, la dificultad de determinación a nivel de especie de ciertos grupos por lo que ante cualquier duda se han excluido del catálogo. La segunda, la falta de muestros de carpóforos hipogeos. Rubio et al. 2006 citan 37 especies de hongos hipogeos, posiblemente asociados, con *C. sativa* en Asturias, entre los que cabe destacar varias especies del género *Tuber* por su importancia desde un punto de vista económico y de posibilidad de utilización en micorrización en vivero.

Considerando además la potencialidad que pudimos observar de productividad de hongos ectomicorrícicos comestibles (*Amanita caesarea*, *Boletus* spp., *Cantharellus cibarius*, *Craterellus* spp., *Hydnum* spp., ...) creemos necesario el planteamiento de mayores estudios en los castaños del Bierzo. Es necesario ampliar el conocimiento en las variaciones de abundancia y riqueza de carpóforos en relación a variables climáticas, vegetación y prácticas silvícolas de los castaños. Así se podrían comenzar a desarrollar programas de gestión y conservación de la diversidad fúngica como recurso forestal, dinamizador de la economía y desarrollo rural de la zona.

Capítulo 3

Caracterización de las comunidades ectomicorrícicas de *Castanea sativa* Mill. en el Bierzo

3.1 Introducción

Los hongos ectomicorrícicos (ECM) no son un grupo monofilético, estudios filogenéticos y de identificación molecular sugieren que esta simbiosis ha surgido independientemente y ha persistido al menos en 66 ocasiones en los hongos Basidiomycota, Ascomycota y Zygomycota (Tedersoo et al. 2010a). Se estima que existen unas 6000 especies de hongos ECM que se asocian con 20.000-25.000 especies de plantas (Rinaldi et al. 2008; Brundrett et al. 2009). Sin embargo, debido a su condición subterránea y su ciclo de vida críptico, aún hay muchas cuestiones sin resolver en cuanto a la estructura, composición y distribución de los hongos ectomicorrícicos (ECMM). Entre ellas, la determinación de la riqueza y abundancia de las especies que componen estas comunidades en diversos ecosistemas y la relación entre su diversidad taxonómica y la diversidad funcional que en ellos desempeñan.

Desde la primera descripción de una ectomicorriza a finales del siglo XIX (Frank 1885) y hasta las últimas dos décadas, los estudios de comunidades ECM se han basado principalmente en la información obtenida a partir de la recolección de sus cuerpos fructíferos (Arnolds 1991; Gehring et al. 1998; Vogt 1992). Estos estudios, aunque proporcionan información de gran importancia desde el punto de vista de fenología y productividad, no recogen una parte importante de la riqueza fúngica (Koide et al. 2005). Por ejemplo, no suelen incluir especies con fenología irregular o especies, que como en el caso de *Tomentella* spp. (familia *Thelephoraceae*), producen cuerpos fructíferos que pasan desapercibidos por su tamaño o morfología. Sin embargo, las especies de *Tomentella* son en general muy abundantes en las raíces, llegando a colonizar, por ejemplo, hasta un 7% de las raíces de roble en Europa (Suz et al. 2014). Además, no siempre la abundancia relativa de los cuerpos fructíferos refleja en su totalidad la de sus estructuras vegetativas como las micorrizas (Gardes y Bruns 1996; Kåren & Nylund 1996; Dahlberg et al. 1997; Taylor 2002; Richard et al. 2005) y el micelio (Kjøller et al. 2006; Peintner et al. 2007).

Por ello, con el fin de obtener una visión más global y exacta de la comunidad ECM en un ecosistema es necesario complementar los inventarios de cuerpos fructíferos con los de micorrizas. Las micorrizas pueden en algunos casos identificarse mediante su morfología y anatomía - morfotipado- (Agerer 1987-2012), que en algunos casos, son diagnósticas de especie, pero en general, sólo permiten agrupar las micorrizas en morfotipos, que pueden incluir más de una especie (Dahlberg 2001). La identificación morfológica y anatómica de las

micorrizas requiere tiempo y experiencia y poco a poco ha sido desplazada por la utilización de técnicas moleculares (Gardes y Bruns 1993; Horton y Bruns 2001; Peay et al. 2008). Sin embargo, es útil para disminuir el número total de micorrizas a secuenciar y permite calcular abundancias relativas y disminuir costes. La secuenciación de micorrizas individuales se utiliza en estudios de diversidad de hongos ECM a distintas escalas geográficas (Cox et al. 2010; Jarvis et al. 2013; Suz et al. 2014). Otros estudios utilizan secuenciación masiva, como pirosecuenciación (Buee et al. 2009; Tedersoo et al. 2010b) y secuenciación de nueva generación, que permiten secuenciar todos los hongos presentes en las raíces o en el suelo, pero ofrecen la desventaja de no ser cuantitativos (ya que están basados casi siempre en la PCR) y a veces es difícil asignar la condición ectomicorrícica de los hongos ya que las secuencias no se obtienen de micorrizas individuales y activas. Cuando se trabaja con morfotipos, a cada micorriza se les puede asignar un tipo de exploración de suelo (Agerer 2001, 2006) basado en la abundancia de hifas que emergen del manto y en la formación y complejidad de rizomorfos, estructuras especializadas en el transporte de agua y nutrientes. El tipo de exploración del suelo, proporciona información sobre como estos hongos exploran el suelo y el uso que hacen del carbono y nitrógeno.

Castanea sativa Mill. establece asociaciones ectomicorrícicas (Harley y Harley 1987; De Román et al. 2005), sin embargo, el número de estudios sobre la diversidad de hongos que se asocian con sus raíces, sobre su ecología o sobre la gestión sostenible de castaños es escaso (Baptista et al. 2009, 2015) e inexistente en España. Los hongos ECM, además de proporcionar nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) y agua (aumentan hasta diez veces la superficie de absorción de las raíces) a las plantas con la que se asocian, les confieren resistencia contra algunos patógenos de raíz (Branzanti et al. 1999; Martins 2004). Por lo tanto, el conocimiento de la diversidad de hongos asociados con castaños a escala local, además de proporcionar información básica sobre la diversidad de estos hongos de cara a futuros cambios en las masas de castaño, podría dar información para un manejo y gestión de los castaños que mejore su estado fitosanitario.

El objetivo de este capítulo ha sido tener una primera aproximación de las comunidades de hongos ectomicorrícicos asociados a las raíces de *C. sativa* en el Bierzo. Este trabajo complementa y amplía por tanto el capítulo anterior dando información sobre las comunidades micorrizas bajo suelo.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Muestreo de raíces

Durante la primavera de 2006 se tomaron muestras de suelo en seis masas de *C. sativa* en el Bierzo: (1) El Espino, soto (42.71861, -6.64527; 720 m); (2) Espanillo, soto (42,66972, -6,7;

547 m); (3) Las Médulas, monte bajo (42.455, -6.75694; 874 m); (4) Las Médulas, soto (42.45505, -6.75705; 834 m); (5) Oencia, soto (42.53774159 -6.96201334; 802 m); (6) Tombrio de Arriba, soto (42.7105, -6.58916; 870 m).

En cada parcela se marcaron cinco castaños separados por 100 m de distancia; en cada árbol se tomaron cuatro muestras de suelo incluyendo sistema radical, a 50-100 cm de distancia del tronco. Para ello se utilizó un hexágono de acero diseñado para obtener bloques de 15 cm de profundidad y un litro de suelo. Se recogieron un total de 120 muestras (20 muestras por parcela).

3.2.2. Evaluación del estado de colonización fúngica de las raíces

Las cuatro muestras de cada árbol se mezclaron y se tomó una submuestra de 3 gramos de raíz para análisis. Se realizó una cuantificación del porcentaje total de colonización (nº ápices micorrícicos/nº total de ápices radiculares), así como el porcentaje de ápices micorrícicos activos y no activos. Así mismo se tomaron datos de peso de raíz por muestra y longitud de raíz secundaria. Se analizaron un total de 30 submuestras (correspondientes a 5 muestras por parcela).

3.2.3. Caracterización de morfotipos

Los diferentes morfotipos se separaron en función de sus características morfológicas incluyendo tipo de ramificación, forma, color y textura del manto y tipos de elementos emergentes (Agerer 1987-2012). Se contó el número total de ápices micorrizados de cada morfotipo y se conservaron en alcohol como material de herbario. Aquellos morfotipos de los que se encontró material suficiente (un total de 157) se limpiaron y conservaron en tampón de extracción FG1 (Omega Bioteck) para su posterior análisis molecular.

3.2.4. Análisis molecular de las micorrizas

Se procesó de una a tres micorrizas micorriza de cada uno de los 157 morfotipos. El ADN de cada morfotipo se extrajo utilizando 10 µl de tampón de extracción Extract-N-Amp (Sigma) y la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosómico nuclear se amplificó utilizando los iniciadores específicos para hongos ITS1F e ITS4 (Gardes y Bruns, 1993; White et al. 1990). Los amplímeros se purificaron mediante ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, USA) y se secuenciaron en ambas direcciones utilizando BigDye3.1 en un secuenciador ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en los Jardines Botánicos de Kew, en Londres, Reino Unido. Las secuencias se editaron mediante Sequencher v4.2 y se realizaron búsquedas BLAST en GenBank y UNITE para su identificación.

3.3. Resultados

Se clasificaron un total de 369 morfotipos conservados como material de herbario en viales con alcohol en el Herbario -Jaime Andrés Rodríguez -LEB- de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León. De los 369 morfotipos, se secuenciaron 157 y se obtuvieron secuencias ITS de 125, de los cuales 100 corresponden a hongos ECM, 14 son de condición ectomicorrícica probable (*Helotiales*, marcados como ECM* en la Tabla 3.1) y 11 son endófitos y otros hongos asociados a raíces (no ECM en la tabla) (Tabla 3.1). Entre los 104 morfotipos se han identificado mediante similitud con las secuencias en GenBank e UNITE, 78 taxones distintos pertenecientes a 21 familias. Un 90% de las micorrizas encontradas son basidiomicetes, el 10% son ascomicetes. Las secuencias ITS representativas de cada morfotipo se incluyeron en GenBank (por el momento no están incluidas en Tabla 3.1)

El grupo más abundante en especies fue *Telephoraceae* (14,9%), seguido de *Russulaceae* (13,5%), *Leotiomyces* (9,46%), *Bankeraceae* (8,11%) and *Sebacinaceae* (6,76%) (Tabla 3.2).

Cerca del 86% de los hongos encontrados forman fructificaciones epigeas, aproximadamente 9% son hipogeos y el 5% se desconoce (incluyendo *Cenococcum* y taxones identificados a nivel de orden o división).

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ORDEN	ECOLOGIA
El Espino	1	ALM296	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	HM190074.1	100	667/673(99%)	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Boletaceae	ECM
El Espino	1	ALM297	<i>Xerocomellus chrysenterum</i>	AJ419223.1	96	674/682(99%)	<i>Xerocomellus chrysenterum</i>	Boletaceae	ECM
El Espino	1	ALM299	Uncultured fungus	GU366722.1	99	243/381(64%)	Fungus	Fungi	Desconocida
El Espino	1	ALM300	<i>Genea hispidula</i>	JX679370.1	99	395/398(99%)	<i>Genea hispidula</i>	Pyrenomataceae	ECM
El Espino	2	ALM113	<i>Russula risigallina</i>	DQ422022.1	11	46/49(94%)	<i>Russula</i> sp.1	Russulaceae	ECM+
El Espino	2	ALM119	<i>Russula risigallina</i>	DQ422022.1	91	49/56(88%)	<i>Russula</i> sp.1	Russulaceae	ECM+
El Espino	2	ALM112	<i>Ascomycota</i> sp	HM190131.1	100	526/526(100%)	<i>Helotiales</i> sp.3	Leotiomyces	ECM*
El Espino	3	ALM170	<i>Clavulina</i> sp.	KM576335.1	90	542/645(84%)	<i>Clavulina</i> sp.2	Clavulinaceae	ECM+
El Espino	3	ALM174	<i>Leotiomyces</i>	DQ420905.1	95	487/551(88%)	<i>Leotiomyces</i> sp.	Leotiomyces	NO
El Espino	4	ALM182	<i>Cenococcum</i> sp.	AB828007.1	99	942/998(94%)	<i>Cenococcum geophilum</i>	Gloniaceae	ECM
El Espino	4	ALM183	<i>Russula</i> sp.	KM576565.1	98	381/665(57%)	<i>Russula</i> sp.5	Russulaceae	ECM+
El Espino	4	ALM184	<i>Paxillus involutus</i>	AJ438984.1	49	216/234(92%)	<i>Paxillus involutus</i>	Paxillaceae	ECM
El Espino	4	ALM185	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981.1	100	667/668(99%)	<i>Lactarius seriffus</i>	Russulaceae	ECM
El Espino	4	ALM186	<i>Sebacinaceae</i> sp.	HM146865.1	99	578/578(100%)	<i>Sebacina</i> sp.3	Sebacinaceae	ECM
El Espino	4	ALM188	Soil fungus	GU174422.1	100	520/521(99%)	Fungus	Fungi	Desconocida
El Espino	4	ALM188	<i>Russula</i> sp.	FR852111.1	100	659/660(99%)	<i>Russula atropurpurea</i>	Russulaceae	ECM
El Espino	4	ALM189	<i>Russulaceae</i>	GU256185.1	95	152/178(85%)	<i>Russula</i> sp.	Russulaceae	ECM+

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleótidos. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= número de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ORDEN	ECOLOGIA
El Espino	4	ALM191	<i>Tomentella</i> sp.	AB808014.1	14	93/93(100%)	<i>Tomentella</i> sp.	Thelephoraceae	ECM
El Espino	4	ALM192	<i>Sebacina</i> sp.	HM146865.1	99	578/578(100%)	<i>Sebacina</i> sp.3	Sebacinaceae	ECM
El Espino	4	ALM193	<i>Pezizomycotina</i> sp.	HF674542.1	96	511/525(97%)	<i>Helotiales</i> sp.1	Leotiomyces	ECM*
El Espino	5	ALM239	<i>Helotiales</i> sp.	FJ440902.1	100	529/529(100%)	<i>Helotiales</i> sp.4	Leotiomyces	ECM
El Espino	5	ALM234	<i>Hysterangium crassirhachis</i>	DQ365633.1	100	507/551(92%)	<i>Hysterangiaceae</i> sp.2	Hysterangiaceae	ECM
El Espino	5	ALM236	<i>Laccaria laccata</i>	KM067889.1	99	653/653(100%)	<i>Laccaria laccata</i>	Hydnangiaceae	ECM
El Espino	5	ALM235	<i>Pezizomycotina</i> sp.	HF674542.1	100	488/488(100%)	<i>Helotiales</i> sp.1	Leotiomyces	ECM*
El Espino	5	ALM233	<i>Tomentella</i> sp.	HQ336695.1	95	335/387(87%)	<i>Tomentella</i> sp.	Thelephoraceae	ECM+
El Espino	5	ALM238	<i>Meliniomyces</i> sp.	KF617561.1	98	467/506(92%)	<i>Meliniomyces</i> sp.1	Leotiomyces	ECM*
Espanillo	1	ALM052	<i>Russula amoenolens</i>	KF245510.1	99	511/572(89%)	<i>Russula amoenolens</i>	Russulaceae	ECM+
Espanillo	1	ALM055	<i>Piloderma</i> sp.	KM576313.1	100	586/594(99%)	<i>Piloderma</i> sp.1	Atheliaceae	ECM
Espanillo	1	ALM058	<i>Russula amoenolens</i>	KF245510.1	100	610/619(99%)	<i>Russula amoenolens</i>	Russulaceae	ECM
Espanillo	1	ALM059	<i>Clavulina</i> sp.	FR852043.1	99	626/629(99%)	<i>Clavulina</i> sp.1	Clavulinaceae	ECM
Espanillo	1	ALM318	<i>Russula</i> sp.	KM576565.1	99	648/650(99%)	<i>Russula</i> sp.5	Russulaceae	ECM
Espanillo	1	ALM319	<i>Neonectria radiculicola</i>	HQ873702.1	47	178/254(70%)	<i>Hypocreales</i> sp.	Hypocreales	non ECM
Espanillo	1	ALM051	<i>Tomentella</i> sp.	FR852161.1	99	267/333(80%)	<i>Tomentella</i> sp.1	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	1	ALM053	<i>Pezizomycotina</i> sp.	HF674633.1	100	473/492(96%)	<i>Helotiales</i> sp.6	Leotiomyces	ECM*

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ORDEN	ECOLOGIA
Espanillo	1	ALM321	<i>Tomentella</i> sp.	KM576644.1	100	307/320(96%)	<i>Tomentella</i> sp.	Thelephoraceae	ECM+
Espanillo	2	ALM020	<i>Lactarius</i> sp.	KR025580.1	99	424/572(74%)	<i>Lactarius</i> sp.1	Russulaceae	ECM
Espanillo	2	ALM153	<i>Russula</i> sp.	KM576533.1	17	112/113(99%)	<i>Russula</i> sp.4	Russulaceae	ECM+
Espanillo	2	ALM145	<i>Tomentella</i> sp.	KM576631.1	100	632/633(99%)	<i>Tomentella</i> sp.2	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	3	ALM363	<i>Sarcodon</i> sp.	N135195.1	100	617/623(99%)	<i>Sarcodon</i> sp.1	Bankeraceae	ECM
Espanillo	4	ALM323	<i>Elaphomyces citrinus</i>	JF907986.1	97	460/541(85%)	<i>Elaphomyces</i> sp.1	Elaphomycetaceae	ECM+
Espanillo	4	ALM326	<i>Cortinarius</i> sp.	KM576374.1	100	507/515(98%)	<i>Cortinarius</i> sp.2	Cortinariaceae	ECM
Espanillo	4	ALM327	<i>Hysterangium crassirhachis</i>	DQ365632.1	99	516/574(90%)	<i>Hysterangiaceae</i> sp.1	Hysterangiaceae	ECM
Espanillo	4	ALM331	Uncultured fungus	LN881878.1	100	91/109(83%)	<i>Ilyonectria</i> sp.1	Hypocreales	no ECM
Espanillo	4	ALM332	Ectomycorrhizal fungus	HE979234.1	100	565/567(99%)	<i>Pezizaceae</i> sp.1 (<i>Pachyphloeus</i>)	Pezizaceae	ECM
Espanillo	4	ALM333	<i>Clavulina</i> sp.	JF519096.1	100	609/612(99%)	<i>Clavulina</i> sp.3	Clavulinaceae	ECM
Espanillo	4	ALM334	<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	GU590932.1	100	790/794(99%)	<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	Cantharellaceae	ECM
Espanillo	4	ALM337	<i>Clavulina</i> sp.	JF519096.1	99	647/648(99%)	<i>Clavulina</i> sp.3	Clavulinaceae	ECM
Espanillo	4	ALM338	Ectomycorrhizal fungus	HE979234.1	99	585/593(99%)	<i>Pezizaceae</i> sp.1 (<i>Pachyphloeus</i>)	Pezizaceae	ECM

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N-ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N-ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ORDEN	ECOLOGIA
Espanillo	4	ALM339	<i>Phellodon confluens</i>	KC571754.1	93	291/344(85%)	<i>Phellodon</i> sp. (cf. <i>confluens</i>)	Bankeraceae	ECM
Espanillo	4	ALM324	<i>Tomentella badia</i>	HQ703025.1	100	592/600(99%)	<i>Tomentella</i> sp.9	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	4	ALM335	<i>Helotiales</i> sp.	JX243905.1	99	527/548(96%)	<i>Helotiales</i> sp.2	Leotiomycetes	ECM*
Espanillo	4	ALM364	<i>Thelephoraceae</i> sp.	KC986281.1	100	634/637(99%)	<i>Tomentella</i> sp.6	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	4	ALM329	<i>Tomentella</i> sp.	KC986281.1	100	570/570(100%)	<i>Tomentella</i> sp.6	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	5	ALM349	<i>Tomentella</i> sp.	FR852144.1	29	470/542(87%)	<i>Tomentella</i> sp.	Thelephoraceae	ECM+
Espanillo	5	ALM348	<i>Russula</i> sp.	KP781009.1	99	576/604(95%)	<i>Russula</i> sp.8	Russulaceae	ECM+
Espanillo	5	ALM350	<i>Amanita phalloides</i>	KT239525.1	100	612/612(100%)	<i>Amanita phalloides</i>	Amanitaceae	ECM
Espanillo	5	ALM357	<i>Tomentella</i> sp.	JF748069.1	100	595/641(93%)	<i>Tomentella</i> sp.5	Thelephoraceae	ECM
Espanillo	5	ALM347	<i>Tomentella</i> sp.	KM576648.1	100	620/641(97%)	<i>Tomentella</i> sp.7	Thelephoraceae	ECM
Médulas a	1	ALM009	<i>Thelephoraceae</i> sp.	JQ975985.1	100	630/631(99%)	<i>Thelephorac2eae</i> sp.	Thelephoraceae	ECM
Médulas a	1	ALM021	<i>Russula</i> sp.	FR852095.1	100	594/604(98%)	<i>Russula</i> sp.6	Russulaceae	ECM
Médulas a	1	ALM023	<i>Tomentella</i> sp.	JF506819.1	100	585/659(89%)	<i>Tomentella</i> sp.2	Thelephoraceae	ECM
Médulas a	1	ALM025	<i>Laccaria</i> sp.	FR852306.1	100	655/658(99%)	<i>Laccaria amethystina</i>	Hydnangiaceae	ECM
Médulas a	1	ALM026	<i>Ilyonectria radiculicola</i>	KC989076.1	100	509/509(100%)	<i>Ilyonectria radiculicola</i>	Hypocreales	no ECM
Médulas a	1	ALM027	<i>Tricholoma</i> sp.	AY462037.1	100	645/645(100%)	<i>Tricholoma sulphureum</i>	Tricholomataceae	ECM

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ ORDEN	ECOLOGIA
Médulas a	1	ALM029	<i>Pezizales</i> sp.	KM576477.1	97	596/623(96%)	<i>Pezizales</i> sp.1	Pezizaceae	ECM
Médulas a	1	ALM030	<i>Sebacina</i> sp.	AF440641.1	98	593/595(99%)	<i>Sebacina</i> sp.2	Sebacinaceae	ECM
Médulas a	1	ALM031	<i>Sebacina</i> sp.	FR852339.1	100	582/584(99%)	<i>Sebacina</i> sp.4	Sebacinaceae	ECM
Médulas a	1	ALM037	<i>Thelephoraceae</i> sp.	HQ667922.1	99	554/613(90%)	<i>Thelephoraceae</i> sp.1	Thelephoraceae	ECM+
Médulas a	1	ALM045	<i>Pachyphlodes melanoxanthus</i>	JX414217.1	100	641/641(100%)	<i>Pachyphlodes melanoxanthus</i>	Pezizaceae	ECM
Médulas a	1	ALM046	<i>Russula</i> sp.	KM576545.1	100	630/676(93%)	<i>Russula</i> sp.2	Russulaceae	ECM
Médulas a	1	ALM087	<i>Inocybe</i> sp.	AB831857.1	100	696/699(99%)	<i>Inocybe</i> sp.2	Inocybaceae	ECM
Médulas a	1	ALM022	<i>Hyaloscyphaceae</i> sp.	KF359568.1	100	531/534(99%)	<i>Helotiales</i> sp.2	Leotiomycetes	ECM*
Médulas a	2	ALM041	<i>Craterellus cornucopioides</i>	JF907967.1	99	829/831(99%)	<i>Craterellus cornucopioides</i>	Cantharellaceae	ECM
Médulas a	2	ALM044	<i>Tricholoma sulphureum</i>	AY462037.1	100	631/647(98%)	<i>Tricholoma sulphureum</i>	Tricholomataceae	ECM
Médulas a	2	ALM039	<i>Hyaloscyphaceae</i> sp.	KF359568.1	89	391/545(72%)	<i>Helotiales</i> sp.2	Leotiomycetes	ECM*
Médulas a	3	ALM032	<i>Thelephoraceae</i> sp.	HQ336697.1	100	631/633(99%)	<i>Tomentella</i> sp.5	Thelephoraceae	ECM
Médulas a	3	ALM034	<i>Bankeraceae</i>	AJ783970.1	99	584/653(89%)	<i>Bankeraceae</i> sp.1	Bankeraceae	ECM+
Médulas a	3	ALM077	<i>Inocybe</i> sp.	JQ975958.1	100	649/651(99%)	<i>Inocybe</i> sp.1	Inocybaceae	ECM
Médulas a	3	ALM082	<i>Craterellus tubaeiformis</i>	AF385633.1	96	601/602(99%)	<i>Craterellus tubaeiformis</i>	Cantharellaceae	ECM
Médulas a	3	ALM083	<i>Tricholoma</i> sp.	FR852325.1	89	341/465(73%)	<i>Tricholoma sulphureum</i>	Tricholomataceae	ECM+

Tabla 3.1. Micorizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON -este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ ORDEN	ECOLOGIA
Médulas a	3	ALM090	<i>Sebacinaceae</i> sp.	KM576595.1	100	578/590(98%)	<i>Sebacina</i> sp.1	Sebacinaceae	ECM
Médulas a	4	ALM126	<i>Cenococcum</i> sp.	EU668240.1	100	496/497(99%)	<i>Cenococcum geophilum</i>	Gloniaceae	ECM
Médulas a	5	ALM035	<i>Hydnellum spongiosipes</i>	KC571744.1	100	694/696(99%)	<i>Hydnellum spongiosipes</i>	Bankeraceae	ECM
Médulas a	5	ALM136	<i>Ilyonectria raditicola</i>	KC989076.1	100	498/511(97%)	<i>Ilyonectria raditicola</i>	Hypocreales	no ECM
Médulas b	1	ALM230	<i>Sebacinales</i> sp.	KM576599.1	100	600/602(99%)	<i>Sebacinaceae</i> sp.1	Sebacinaceae	ECM
Médulas b	1	ALM224	<i>Russula livescens</i>	JN129398.1	100	649/656(99%)	<i>Russula livescens</i>	Russulaceae	ECM
Médulas b	1	ALM225	<i>Pezizales</i> sp.	FI013080.1	99	290/360(81%)	<i>Pezizales</i> sp.2	Pezizaceae	ECM+
Médulas b	1	ALM228	<i>Genea</i> sp.	AY940643.1	73	393/458(86%)	<i>Genea</i> sp.1	Pyronemataceae	ECM+
Médulas b	1	ALM232	<i>Tuber</i> sp.	FI013059.1	100	533/534(99%)	<i>Tuber borchii</i>	Tuberaceae	ECM
Médulas b	2	ALM304	<i>Helotiales</i> sp.	AB598109.1	99	511/517(99%)	<i>Helotiales</i> sp.5	Leotiomycetes	ECM*
Médulas b	2	ALM312	<i>Cortinarius</i> sp.	KR082888.1	99	556/556(100%)	<i>Cortinarius</i> sp.1	Cortinariaceae	ECM
Médulas b	3	ALM288	<i>Tomentella badia</i>	HQ703025.1	100	549/569(96%)	<i>Tomentella</i> sp.9	Thelephoraceae	ECM
Médulas b	3	ALM291	Uncultured fungus	HQ446093.1	99	513/650(79%)	Fungus	Fungi	Desconocida
Médulas b	3	ALM294	<i>Russula amoenolens</i>	KE245510.1	99	587/591(99%)	<i>Russula amoenolens</i>	Russulaceae	ECM
Médulas b	3	ALM295	<i>Byssocorticium</i> sp.	KM576308.1	100	130/137(95%)	<i>Byssocorticium</i> sp.1	Atheliaceae	ECM+
Médulas b	4	ALM218a	<i>Tomentella</i> sp.	EU668202.1	100	619/639(97%)	<i>Tomentella</i> sp.3	Thelephoraceae	ECM
Médulas b	4	ALM220	<i>Thelephoraceae</i> sp.	FN669266.1	99	540/656(82%)	<i>Tomentella</i> sp.4	Thelephoraceae	ECM

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= número de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB. (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON=este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ ORDEN	ECOLOGIA
Médulas b	4	ALM213	<i>Russula</i> sp.	KM576533.1	100	648/651(99%)	<i>Russula</i> sp.4	Russulaceae	ECM
Médulas b	4	ALM216	<i>Hebeloma aff. cavipes</i>	HF678205.1	100	659/661(99%)	<i>Hebeloma</i> sp.2	Hymenogastraceae	ECM
Médulas b	4	ALM217	<i>Ascomycota</i> sp.	KM576302.1	100	565/575(98%)	<i>Ascomycota</i> sp.1	Ascomycota	ECM*
Médulas b	4	ALM219	<i>Craterellus</i> sp.	KM576330.1	100	707/708(99%)	<i>Cantharellales</i> sp.1	Cantharellaceae	ECM
Médulas b	4	ALM214	<i>Leptodontidium</i> sp.	KF428543.1	100	591/594(99%)	<i>Leptodontidium</i> sp.1	Leotiomyces	no ECM
Médulas b	5	ALM210	<i>Ascomycota</i> sp.	GU174309.1	100	495/541(91%)	<i>Helotiales</i> sp.3	Leotiomyces	ECM*
Médulas b	5	ALM207	<i>Tomentella</i> sp.	FR852173.1	99	632/633(99%)	<i>Tomentella</i> sp.4	Thelephoraceae	ECM
Médulas b	5	ALM203	Hyaloscyphaceae sp.	KF359568.1	100	533/533(100%)	<i>Helotiales</i> sp.2	Leotiomyces	ECM*
Médulas b	5	ALM202	<i>Tuber malacodermum</i>	FJ809889.1	100	706/708(99%)	<i>Tuber malacodermum</i>	Tuberaceae	ECM
Médulas b	5	ALM206	Hyaloscyphaceae sp.	KF359568.1	94	376/555(68%)	<i>Helotiales</i> sp.2	Leotiomyces	ECM*
Médulas b	5	ALM205	<i>Russula</i> sp.	KM576518.1	99	531/606(88%)	<i>Russula</i> sp.3	Russulaceae	ECM
Médulas b	5	ALM204	<i>Uncultured Leptodontidium</i>	KT203171.1	100	593/593(100%)	<i>Leptodontidium</i> sp.2	Leotiomyces	no ECM
Oencia	2	ALM279	<i>Russula</i> sp.	DQ061924.1	29	461/682(68%)	<i>Russula</i> sp.3	Russulaceae	ECM+
Oencia	3	ALM257	<i>Russula</i> sp.	KM576545.1	100	609/629(97%)	<i>Russula</i> sp.2	Russulaceae	ECM
Oencia	3	ALM259	<i>Verticillium</i>	HE972032.1	96	321/508(63%)	<i>Verticillium</i> sp.	Plectosphaerellaceae	no ECM+
Oencia	4	ALM244	<i>Astraeus</i> sp.	AJ629408.1	100	505/565(89%)	<i>Astraeus</i> sp.1	Diplocystaceae	ECM+
Oencia	4	ALM247	<i>Tomentella</i> sp.	KM576641.1	100	580/588(99%)	<i>Tomentella</i> sp.8	Thelephoraceae	ECM

Tabla 3.1. Micorrizas identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. BLASTn-GENBANKS= Basic Local Search Tool -nucleotides. Secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; N. ACCESO= numero de acceso en GenBank de la secuencia mas similar a la obtenida en nuestro estudio del morfotipo, tras búsqueda BLAST en GenBank; COB, (%)= Porcentaje de cobertura de la secuencia con la de GenBank; Similitud (bp)= Similitud en pares de bases (pb) de la secuencia obtenida en este estudio con las mas similar en GenBank; TAXON= este estudio= Identificación de la secuencia obtenida del morfotipo en este estudio.

LOCALIDAD	N	CÓDIGO	BLASTn - GENBANK	N. ACCESO	COB. (%)	SIMILITUD (bp)	TAXON	FAMILIA/ ORDEN	ECOLOGIA
Tombrio	1	ALM049	<i>Tomentella badia</i>	HQ703025.1	100	635/635(100%)	<i>Tomentella</i> sp.9	Thelephoraceae	ECM
Tombrio	1	ALM050	<i>Tomentella</i> sp.	JF506819.1	100	634/634(100%)	<i>Tomentella</i> sp.2	Thelephoraceae	ECM
Tombrio	1	ALM200	<i>Tomentella</i> sp.	KM576631.1	88	474/597(79%)	<i>Tomentella</i> sp.2	Thelephoraceae	ECM
Tombrio	2	ALM159	<i>Sarcodon glaucopus</i>	JQ888205.1	99	430/632(68%)	<i>Sarcodon</i> sp.2	Bankeraceae	ECM
Tombrio	2	ALM161	<i>Hebeloma</i> sp.	EU668235.1	100	664/665(99%)	<i>Hebeloma</i> sp.1	Hymenogastraceae	ECM
Tombrio	2	ALM167	<i>Cenococcum</i> sp.	JF506744.1	99	481/482(99%)	<i>Cenococcum geophilum</i>	Gloniaceae	ECM
Tombrio	5	ALM064	<i>Hydnellum conrescens</i>	EU784267.1	100	650/650(100%)	<i>Hydnellum conrescens</i>	Bankeraceae	ECM
Tombrio	5	ALM066	<i>Sebacinaeae</i> sp.	KM576595.1	100	534/539(99%)	<i>Sebacina</i> sp.1	Sebacinaeae	ECM
Tombrio	5	ALM074	<i>Russula</i> sp.	KM576511.1	100	580/633(92%)	<i>Russula</i> sp.7	Russulaceae	ECM+

Tabla 3.2. Morfotipos y taxones ECM analizados. Coincidencia con fructificaciones.

Familia	Nº morfotipos ECM	Nº especies	Abundancia relativa morfotipos	Abundancia relativa especies ECM	nº especies fructificaciones	coincidentes
Amanitaceae	2	1	1,75 %	1,35 %	16	1
Ascomycota	1	1	0,88 %	1,35 %	0	
Atheliaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	0	
Bankeraceae	6	6	5,26 %	8,11 %	3	
Boletaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	19	1
Cantharellaceae	4	4	3,51 %	5,41 %	4	2
Clavulinaceae	4	3	3,51 %	4,05 %	0	
Cortinariaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	22	
Dyplocistidiaceae	1	1	0,88 %	1,35 %	1	
Elaphomycetaceae	1	1	0,88 %	1,35 %	0	
Gloniaceae	3	1	2,63 %	1,35 %	0	
Hydnaceae	0	0	0,00 %	0,00 %	2	
Hydnangiaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	3	2
Hymenosgastraceae	2	2	1,75 %	2,70 %	0	
Hysterangiaceae	2	2	1,75 %	2,70 %		
Inocybaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	5	
Leotiomyces	14	7	12,28 %	9,46 %	1	
Paxillaceae	1	1	0,88 %	1,35 %	1	1
Pezizaceae	5	3	4,39 %	4,05 %		
Pyronemataceae	2	2	1,75 %	2,70 %	0	
Russulaceae	21	10	18,42 %	13,51 %	25	
Sebacinaceae	7	5	6,14 %	6,76 %	0	
Telephoraceae	23	11	20,18 %	14,86 %	0	
Tricholomataceae	3	1	2,63 %	1,35 %	6	1
Tuberaceae	2	2	1,75 %	2,70 %	0	



Figura 3.1. Carpóforos su ectomicorizas correspondiente. **a)** *Amanita phalloides*, carpóforos; **b)** *A. phalloides*, morfotipo ALM350; **c)** *Craterellus tubaeformis* carpóforos; **d)** *C. tubaeformis* morfotipo ALM082; **e)** *Craterellus cornucopioides* carpóforos, **f)** *C. cornucopioides* morfotipo ALM041; **g)** *Laccaria amethystina* carpóforos; **h)** *L. amethystina* morfotipo ALM025 ; **i)** *Paxillus involutus* carpóforos; **j)** *P. involutus* morfotipo ALM184; **k)** *Russula risigallina* carpóforos; **l)** *R. risigallina* morfotipo ALM113; **m)** *Xerocomellus chrysenteron* carpóforos; **n)** *X. chrysenteron* morfotipo ALM297.

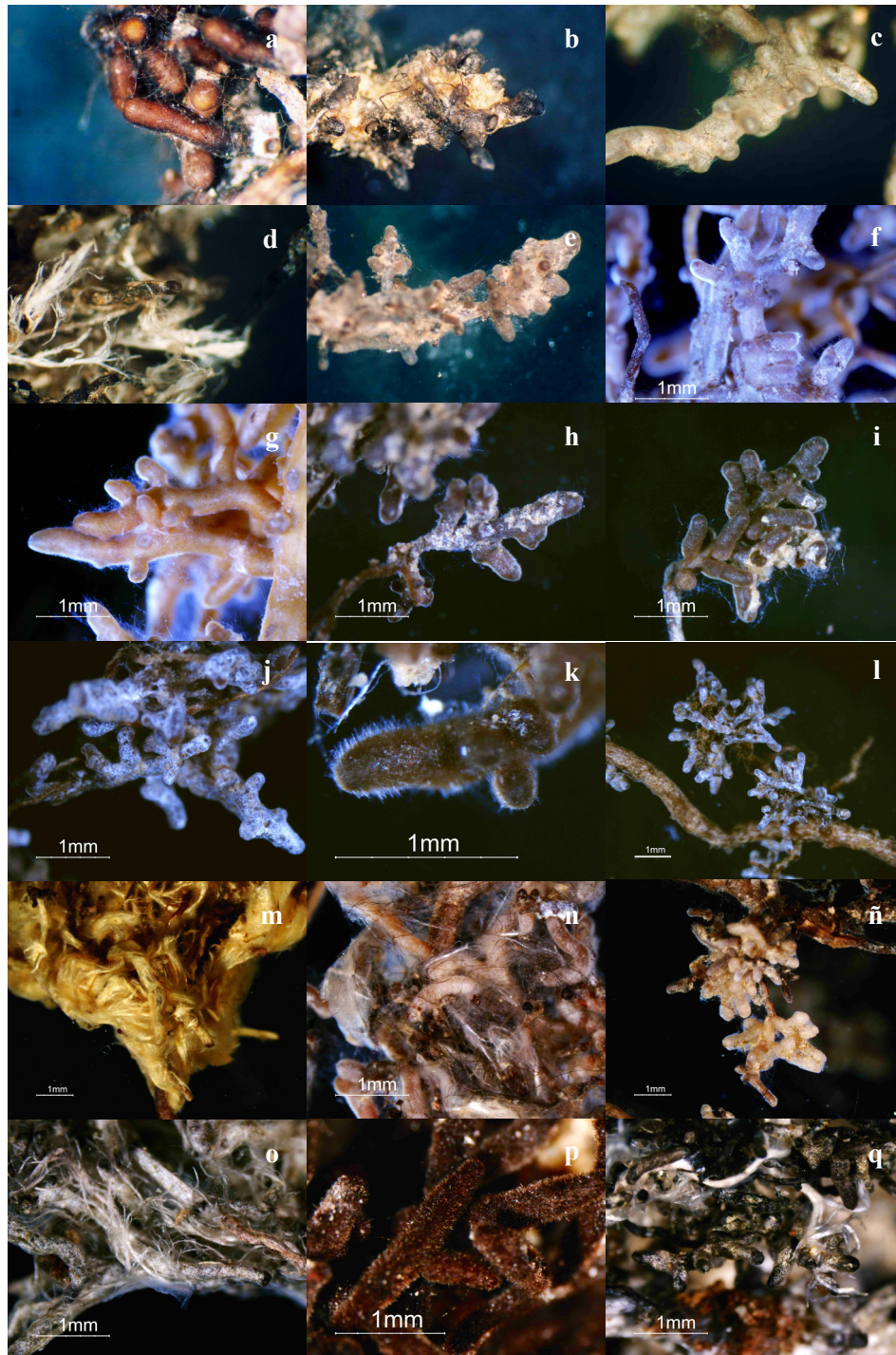


Figura 3.2. Ectomicorizas de *Castanea sativa* identificadas mediante secuenciación de la región ITS del ADNr a través de búsquedas BLASTn en GenBank. **a)** *Genea hispidula*, ALM300; **b)** *Thelephoraceae* sp., ALM009 **c)** *Inocybe* sp.1 ALM077; **d)** *Bankeraceae* sp.1, ALM 034; **e)** *Helotiales* sp.2, ALM022; **f)** *Russula amoenolens*, ALM052; **g)** *Lactarius* sp.; ALM020; **h)** *Tuber malacodermum*, ALM202; **i)** *Leptodontidium* sp.1, ALM214; **j)** *Pezizales* sp.2, ALM225; **k)** *Tuber borchii*, ALM232; **l)** *Astraeus* sp.1, ALM244; **m)** *Elaphomyces* sp.1, ALM323; **n)** *Cortinarius* sp.2, ALM326; **ñ)** *Pezizaceae* sp.1 (*Pachyphloeus*), ALM338; **o)** *Phellodon* sp. (cf. *confluens*), ALM339; **p)** *Tomentella* sp.5, ALM357; **q)** *Sarcodon* sp.1, ALM363.

3.4. Discusión

Por medio de la clasificación en morfotipos y la secuenciación de la región ITS se han identificado 78 hongos ECM en masas de *Castanea sativa* en el Bierzo, en su mayoría basidiomicetes. La mayor abundancia de las familias *Telephoraceae* y *Russulaceae* coincide con estudios realizados previamente en bosques de otras especies de árboles (Tedersoo et al. 2003; De Román y De Miguel 2005; Richard et al. 2005; Courty et al. 2008; Azul et al. 2010; Suz et al. 2014). Es llamativa la abundancia de especies pertenecientes a la familia *Bankeraceae*, ya que en Europa se registro en los 90 una disminución en la producción de carpóforos de estas especies que se atribuyó principalmente a un incremento en la polución atmosférica de nitrógeno (Arnolds 1991; Arnolds 2010). En esta familia, las micorrizas presentan un tipo de exploración de suelo de hifas hidrofóbicas que forman estructuras en forma de abanico y rizomorfos que exploran el suelo y que parecen estar relacionadas con la adquisición de nitrógeno en zonas en las que no está muy disponible o es limitante (Lilleskov et al. 2011)

Si comparamos los resultados del estudio de ectomicorrizas con los del capítulo anterior de esta memoria en el que se caracterizó la diversidad de hongos epigeos ectomicorrícicos de *C. sativa*, vemos una correlación muy baja entre los dos tipos de muestreo de comunidades. En ambos muestreos el phylum mayoritario es Basidiomycota, pero al estudiar la simbiosis a nivel de sistema radical vemos que el número de taxones pertenecientes al phylum Ascomycota aumenta considerablemente (de 4 observadas por fructificaciones a 22 identificadas por ectomicorrizas). Esto es debido en parte a que algunos de esos hongos forman fructificaciones difíciles de observar en campo (como es el caso de *Helotiales* sp) o producen cuerpos fructíferos hipogeos (como los géneros *Tuber* y *Genea*). Lo mismo sucede con *Telephoraceae*, muy abundantes en la comunidad a nivel de raíz, no fueron detectados en muestreos de carpóforos porque suelen pasar desapercibidos en campo. Las familias *Amanitaceae*, *Boletaceae* y *Cortinariaceae* que fueron las más abundantes en cuanto a observación de sus estructuras reproductoras están mínimamente representadas en el muestreo de ectomicorrizas (*Amanitaceae* 2 taxones frente a 16 en fructificaciones; *Boletaceae* 2 taxa frente a 19; *Cortinariaceae* 2 taxa frente a 22) (Tabla 3.2). En el caso concreto de *Boletus* spp., igual que en Peintner et al. (2007), el número de micorrizas es bajo en las raíces, pero sus esporocarpos dominan en las masas de *C. sativa*. *Russulaceae* fue el grupo más equilibrado en los dos análisis de la comunidad. A nivel específico la discrepancia entre los dos enfoques fue más visible, sólo 8 de 192 taxones ectomicorrícicos totales fueron identificados por ambos análisis (*Amanita phalloides*, *Craterellus cornucopioides*, *C. tubaeiformis*, *Laccaria amethystina*, *L. laccata*, *Pseudocraterellus undulatus*, *Tricholoma sulphureum* y *Xerocumellus chrysenteron*). La falta de correspondencia en cuanto a especies en el caso del género *Russula* podría ser debido por una parte, a la dificultad que supone la asignación de especie en el caso de las micorrizas sin

secuencias disponibles de cuerpos fructíferos bien identificados en las bases de datos y por otra parte, a que necesitaría llevar a cabo análisis filogenéticos incluyendo secuencias de especímenes tipo para identificarlas adecuadamente. El muestreo de micorrizas se ha realizado una única vez, y aunque cierta estacionalidad se ha observado en comunidades ECM (Izzo et al. 2005, Koide et al. 2007) las especies dominantes suelen ser detectadas independientemente de la estación (Suz et al. 2014).

La detección molecular de la presencia de forma natural de dos especies del género *Tuber*, *T. borchii* y *T. malacodermum* resulta de gran interés desde el punto de vista de abrir una línea de producción de planta micorrizada de *C. sativa* en vivero con especies de hongos ectomicorrícicos comestibles. *T. borchii* está presente en casi toda la Península Ibérica aunque no hay tradición de su recolección y comercialización. Se han realizado plantaciones de esta especie en Italia y Nueva Zelanda, observándose beneficios en las plantas gracias a la micorrización, por lo su producción en vivero tendría un doble interés, la producción de trufa y la mejora del crecimiento del árbol (Morcillo et al. 2015).

Nuestros resultados indican que en el Bierzo, *C. sativa* establece comunidades de ECM dominadas por géneros comunes a otros miembros de *Fagaceae* como *Quercus ilex*, *Q. suber*, *Q. robur* y *Q. petraea* (Richard et al. 2005; Azul et al. 2010; Suz et al. 2014). Además confirman la baja coincidencia entre cuerpos fructíferos y ectomicorrizas previamente indicado en otros estudios (Kjøller 2006; Peintner et al. 2007; Baptista et al. 2015; Taschen et al. 2015), por lo que son enfoques complementarios necesarios para obtener una visión global de las comunidades fúngicas.



OBTENCIÓN EN VIVERO DE PLANTA
MICORRIZADA DE *CASTANEA SATIVA* Mill.
CON *TUBER* spp.

Capítulo 4

Micorrización de *Castanea sativa* Mill. con *Tuber aestivum* Vittad., *T. brumale* Vittad., *T. macrosporum* Vittad. y *T. uncinatum* Chatin

4.1. Introducción

El género *Tuber* P. Micheli ex. F.H. Wigg está constituido por diversas especies de hongos pertenecientes al orden Pezizales (Ascomycota). Son consideradas especies ectomicorrícicas, que normalmente se asocian en ambientes mediterráneos a diferentes especies forestales, tanto árboles como arbustos. Sus carpóforos o ascocarpos son hipogeos y se recolectan por su apreciado aroma, siendo popularmente conocidas como trufas (De Román y De Miguel 2005; Smith and Read 2008). En España son recolectadas principalmente dos especies (*T. melanosporum* Vittad. y *T. aestivum* Vittad.) debido generalmente a razones ligadas con la facilidad de comercialización, aunque se pueden encontrar otras dos especies con interés económico (*T. brumale* Vittad. y *T. borchii* Vittad.). Las trufas ocupan una gran variabilidad de hábitats y se asocian a una gran cantidad de plantas: encinas y robles, sauces, álamos, avellanos, pinos, castaños y algunos arbustos (Napoli et al. 2010). con un contenido mínimo carbonato cálcico, con pH situados entre 7-8, excepto *T. borchii* que tolera suelos ácidos (Napoli et al. 2010).

T. melanosporum tiene una distribución exclusivamente circummediterránea (Ceruti et al. 2003) siendo la segunda especie más cotizada del mundo, tras *T. magnatum* (Benucci et al. 2012a). *T. aestivum*, o trufa de verano, es la trufa con mayor distribución en Europa (Gryndler et al. 2011; Benucci et al. 2012a), ocupando una gran diversidad de ambientes ecológicos, y es más valorada en los mercados exteriores que en nuestro país. *T. uncinatum* actualmente es considerada la misma especie que *T. aestivum* en base a estudios moleculares, y si bien la diferenciación taxonómica es inexistente, sí podrían existir diferencias en cuanto a su ecología (Paolocci et al. 2005; Wedén et al. 2005). *T. brumale* se encuentra de forma natural en España aunque no es recolectada para uso comercial. Fructifica en lugares con cierta humedad edáfica y prospera en algunas plantaciones truferas del norte de la Península Ibérica (Reyna 2007). *T. macrosporum* se encuentra en muchas zonas de Europa (Italia, Francia, Hungría, Península Balcánica). Tiene cualidades organolépticas excepcionales y su mercado es aún incipiente (Benucci et al. 2012b). Forma ectomicorizas con *Corylus avellana* L., *Quercus robur* L., *Tilia platyphyllos* Scop., *Pinus nigra* J.F. Arnold, *Fagus sylvatica* L., *Populus* spp. y *Salix* spp. (Vezzola 2005; Benucci et al. 2012b). Prospera en suelos frescos, ricos en arcillas, con presencia de carbonato cálcico aunque lavados e, incluso, en la cercanía de ríos (Vezzola 2005). En nuestro país aún no ha sido recolectada.

En la actualidad, debido al descenso de producción natural de las truferas, la implantación de plantas micorrizadas con trufa ha supuesto un importante avance en la agromicosilvicultura de nuestro país (Reyna 2007; Morcillo et al. 2015). Las plantas inoculadas en vivero son cultivadas en condiciones de ambiente controlado durante uno o dos años, tiempo necesario para la formación y desarrollo de las micorrizas. Posteriormente ser transplantadas al campo (Reyna 2007; Morcillo et al. 2015). En los últimos años, algunas iniciativas han puesto de relieve la posibilidad de combinar la producción de madera o frutos con la recogida de hongos comestibles (Benucci et al. 2012b). Este hecho es principalmente casual, basado en la instalación de planta en diferentes reforestaciones que han sido naturalmente micorrizadas por alguna de las especies de trufa anteriormente citadas, como puede ocurrir con plantaciones de avellano (Reyna 2007). Algunos autores han propuesto el uso de plantas micorrizadas con trufa negra como un camino para fomentar la reforestación en zonas rurales a la vez que se mejora la rentabilidad económica de las actuaciones forestales (Bonet et al. 2006).

La reforestación se apoya en el desarrollo en vivero de una planta de calidad. En ambientes mediterráneos, donde el factor limitante más importante es la sequía estival (Castro et al. 2004; Villar-Salvador et al. 2013), el éxito de la reforestación está muy ligado a la calidad de la planta, la cual depende en muy buena medida de cómo se han cultivado. En este sentido, la fertilización nitrogenada tiene un papel muy importante en la calidad de la planta y el éxito de las plantaciones forestales (Oliet et al. 2009; Villar-Salvador et al. 2012). En concreto, niveles moderados y elevados de nitrógeno (>100 mg N/planta) influyen positivamente en la calidad morfológica y fisiológica de las plantas caducifolias (Jacobs et al. 2005; Salifu y Jacobs 2006; Patterson y Dimov 2013).

En España, *C. sativa* se sitúa en áreas con una importante humedad ambiental en verano, desde el norte hasta el sur y llegando incluso a Canarias (Ruiz de la Torre 2006; Blanco et al. 1997). Ecológicamente prefiere estaciones con suelos bien drenados y profundos, con ausencia de heladas tardías, y un período de sequía no mayor a dos meses, siendo indispensable una pluviometría estival en torno a 50 mm (Ruiz de la Torre 2006). Prospera desde el nivel del mar hasta los 1.500 m (Ruiz de la Torre 2006; Cuenca y Majada 2012). Suelos preferiblemente ácidos, o básicos con presencia de cal no superior al 4% (Flórez et al. 2001)

El castaño es una especie cultivada por su amplia rentabilidad, debido al doble aprovechamiento de frutos, mediante el uso de variedades productoras y de su madera (Cuenca y Majada 2012). La forma más clásica de producción es a raíz desnuda, aunque en los últimos tiempos ha aumentado su producción en vivero, con uso recomendado de contenedores amplios (de 0,4 a 1 L), y densidad de cultivo elevada (Cuenca y Majada 2012). Su uso es repoblación es limitado, aunque puede acompañar a *Q. ilex* L., *Q. faginea* Lam., *Q. pyrenaica* L., *Q. robur* L. e incluso *Q. suber* L. (Ruiz de la Torre 2006; Cuenca y Majada 2012).

Aunque siempre se ha especulado con la posibilidad de que el castaño europeo pueda asociarse naturalmente con trufas (Benucci et al. 2012b) recientemente se han localizado castaños productores de trufas en la provincia de Girona (M. Morcillo, comunicación personal). Existen pocas experiencias de inoculación de castaño con trufas, siendo los trabajos de Zambonelli con *T. borchii* de los pocos publicados (Zambonelli et al. 1990).

El objetivo de este trabajo ha sido: (1) evaluar la posibilidad de micorrizar castaños con diferentes especies de *Tuber* spp. (*T. aestivum*, y su variedad, *T. uncinatum*; *T. brumale* y *T. macrosporum*); (2) definir los criterios de calidad morfológica y fisiológica para la planta de castaño producida en contenedor forestal con un nivel elevado de fertilización nitrogenada.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Producción de plántulas

Semillas de *C. sativa* de procedencia ES02 (Galicia interior) se esterilizaron en superficie con una solución al 5% de hipoclorito sódico durante 30 min y se lavaron repetidas veces en agua. Posteriormente se sembraron en bandejas rellenas de turba rubia (Kekkila F0, Finandia), humectada con agua destilada, y se colocaron en una cámara de germinación (modelo Incubig, Selecta, España) a 20 °C hasta su germinación. Tras la emergencia de la raíz, cuando el tamaño estaba en torno a 3 cm de longitud, las castañas fueron transferidas a cinco bandejas de 400 mL de capacidad con 32 alveolos (190/400, Plasnor, España). Las bandejas se rellenaron con una mezcla de turba:perlita de 0-10 mm de grosor (80:20 en volumen). La turba que utilizada fue Kekkila F6 y la perlita era de granulometría media.

La turba fue enmendada con dolomita cálcica al 90% hasta alcanzar un pH considerados válidos para el crecimiento de cada especie: 7,2 para *T. macrosporum* (Benucci et al. 2012b), 7,8 para *T. aestivum* y *T. uncinatum* (Paolocci et al. 2004; Wedén et al. 2005), y 8,1 para *T. brumale* (Reyna 2007). El sustrato de las plantas control se ajustó hasta un pH=6.

4.2.2. Producción de inóculo. Inoculación

Las trufas utilizadas como inóculo tienen diferentes procedencias: *T. aestivum* de Soria, *T. macrosporum* de Hungría y *T. brumale* y *T. uncinatum* de Morella (Castellón). Todos los carpóforos fueron confirmados macróscopica y microscópicamente (Figura 4.1). La preparación del inóculo y la dosis se justifica a lo detallado por Domínguez-Núñez et al. 2008. En abril de 2012, tras un período de adaptación, se inocularon las plantas (1 bandeja para cada una de las trufas ensayadas, 32 plantas en total por trufa ensayada).

4.2.3. Cultivo en invernadero

Las condiciones de temperatura en el invernadero fueron de 32 °C como máxima y de 4 °C como mínima y no se sombreó el experimento durante el verano. Se realizó una fertirrigación

semanal desde junio hasta noviembre de 2012 con fertilizante de relación NPK 17-5-19 (Hakaphos, BASF, Alemania) hasta un aporte al final del cultivo de 200 mg de N por planta.

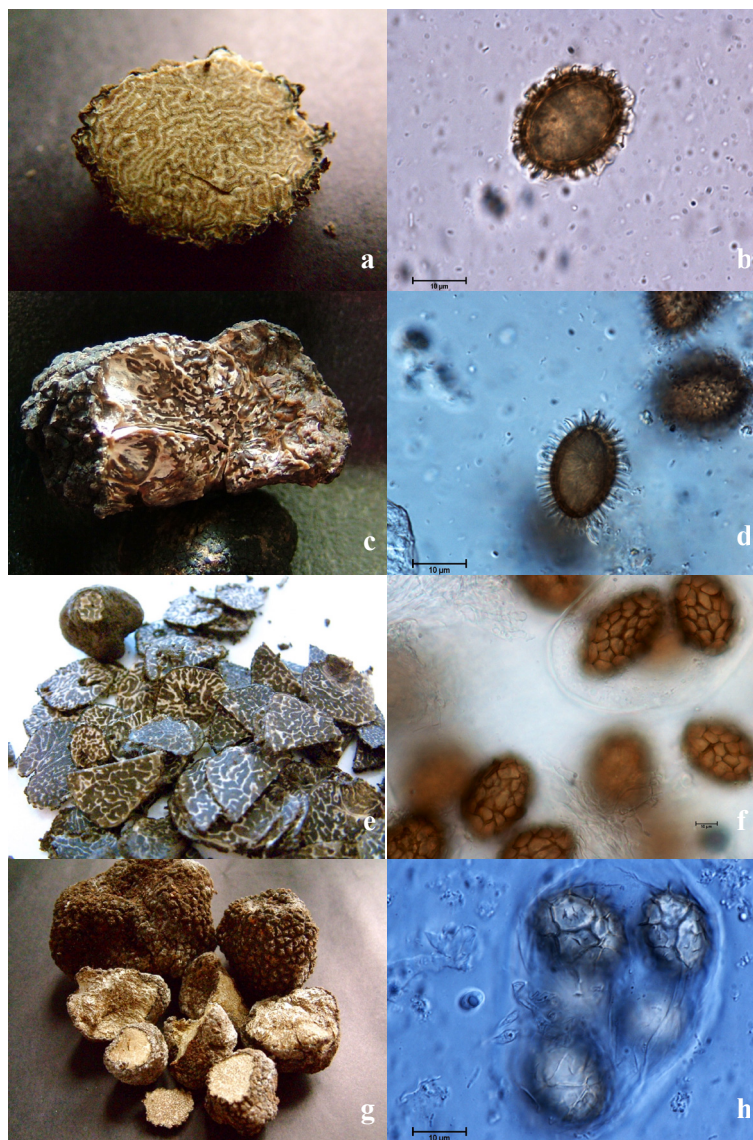


Figura 4.1. Inóculo de diferentes especies de *Tuber*. **a)** carpóforo de *T. aestivum*; **b)** esporas de *T. aestivum*; **c)** carpóforo de *T. borchii*; **d)** esporas de *T. borchii*; **e)** carpóforo de *T. macrosporum*; **f)** esporas de *T. macrosporum*; **g)** carpóforo de *T. uncinatum*; **h)** esporas de *T. uncinatum*.

4.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorrización

El cultivo se mantuvo durante dos años en vivero, con el fin de asegurar la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas. Durante el segundo verano, tras confirmarse visualmente la micorrización, se realizaron mediciones de fisiología en las plantas. Se seleccionaron 10 individuos tratamiento. Se estimaron deficiencias nutricionales mediante el uso de la

fluorescencia de la clorofila. En concreto, se midió el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, que es la relación de la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m) en plantas adaptadas a la oscuridad tanto en madrugada como al mediodía, y el rendimiento cuántico del fotosistema II, Φ_{II} , que estima la eficiencia del fotosistema II en iluminación (Maxwell y Johnson 2000). Para ello se utilizó un fluorímetro (FSM, Hansatech). Además, se realizaron medidas de potencial hídrico para diferenciar tratamientos y evidenciar posibles diferencias en el uso del agua. Las mediciones se realizaron con una cámara de presión de madrugada y al mediodía, utilizando los protocolos descritos en bibliografía (Scholander et al. 1964).

Al finalizar el cultivo (invierno de 2014) los cepellones se lavaron cuidadosamente y se estimó el grado de micorrización siguiendo la metodología descrita por Chevalier y Grente (1979). Las ectomicorizas se identificaron utilizando un estereomicroscopio (Nikon SMZ100) y un microscopio invertido (Nikon Ti-U). Las fotografías se realizaron con una cámara digital (Nikon DS-5Mc y DS-2Mv). La confirmación de los caracteres morfológicos y anatómicos de las micorizas siguen a Agerer (1987-2012).

La confirmación molecular de las micorizas de *T. melanosporum* se realizó mediante PCR por el IRTA (Investigación y Tecnología Agroalimentarias, Cabrils). Para la extracción de ADN genómico de las micorizas se utilizó el producto DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Para la PCR se utilizaron los siguientes cebadores (en función de las especies diana a detectar): *T. aestivum* y *T. uncinatum*, cebadores Tu1sekvF/Tu1sekvF (Grynder et al. 2011); *T. brumale* cebadores ITSb/ITS4LNG (Paolocci et al. 1999) y *T. macrosporum* cebadores TmacrF/TmacrR (Benucci et al. 2011). Se utilizaron dos controles positivos para cada especie obtenidos a partir de carpóforos identificados. Como control negativo se utilizó agua HPLC.

Se caracterizó la morfología de las plantas, midiéndose la altura de la parte aérea y el diámetro en el cuello de la raíz. A continuación, las plantas se desecaron en una estufa durante 48 h a 60 °C y se midió el peso seco de la parte radical y aérea. [Caracteres morfométricos: altura (cm), diámetro (mm), y el peso seco de la parte radical y aérea (g)].

4.2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron analizadas con el test de Shapiro-Wilk y Levene para verificar que cumplieran con los requisitos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente ($\alpha=0,05$). Para determinar la existencia de diferencias significativas entre especies de trufas en las variables morfológicas y fisiológicas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA de 1 factor). Las diferencias entre medias se discriminaron mediante el test de Tukey ($p<0,05$). Cuando la variable no cumplía las condiciones para la realización de la ANOVA, se transformó. Si aún así no se cumplían las exigencias para la realización del test, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

4.3. Resultados

4.3.1. Micorrizas y grado de micorrización

En todos los tratamientos realizados se observó micorrización de las diferentes especies de *Tuber*. Morfológica y anatómicamente las micorrizas coinciden con las descritas con anterioridad para *Tuber aestivum* (Benucci et al. 2012c) y *T. brumale* (Ficher et al. 2004), *T. macrosporum* (Benucci et al. 2012b) y *T. uncinatum* (Müller et al. 1996).

El análisis molecular resultó positivo para las cuatro especies de *Tuber* en *C. sativa* (Figura 4.2).

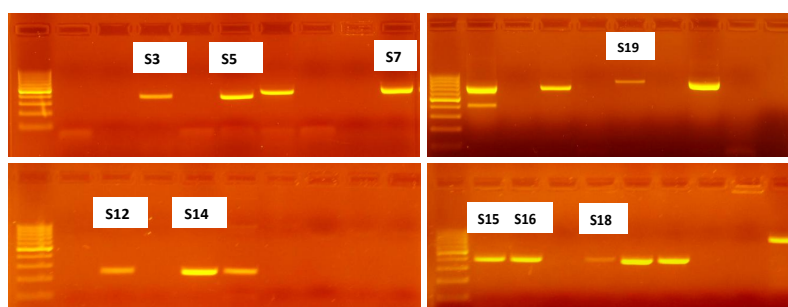


Figura 4.2. Resultados del análisis molecular de las ectomicorrizas de *Tuber* spp. Fotografías con luz ultravioleta de los geles de agarosa. Los códigos se corresponden con los del IRTA: S7= *T. aestivum*, S19= *T. brumale*, S12= *T. macrosporum*, S20= *T. uncinatum*. Las bandas sin código corresponden a los controles positivos. Las bandas de la izquierda corresponden al marcador 100 bp ladder.

Los sistemas micorrícicos de *T. aestivum* (Figura 4.3a-d) y *T. uncinatum* (Figura 4.3m-o) presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, engrosadas en la parte más distal, más raramente cilíndricas, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo amarillento a marrón oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta largos cistidios en el manto externo, simples, con forma de cerda o punzón, hialinos a amarillentos en micorrizas jóvenes, de ocre a marrón en micorrizas adultas. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático con células angulares.

Las sistemas micorrícicos de *T. brumale* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración contacto. Las micorrizas son rectas, cilíndricas, a veces engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de dorado a marrón oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta cistidios cortos en el manto externo, con forma de aguja, amarillo-ámbar y normalmente monoseptados, con verrugas en la superficie. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto El manto externo es

pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle, a veces redondeadas con paredes celulares engrosadas (Figura 4.3e-h).

Las sistemas micorrícicos de *T. macrosporum* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, cilíndricas pocas veces engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo amarillo a o marrón anaranjado. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta largos cistidios en el manto externo, simples, con forma de cerda o punzón, amarillos en micorrizas adultas. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático, con células epidermoides que forman un puzzle (Figura 4.3i-l).

C. sativa formó ectomicorrizas con todas las especies de *Tuber* spp. inoculadas (Tabla 4.1). Las plantas inoculadas con *T. brumale*, *T. aestivum* y *T. uncinatum* estaban bien colonizadas por los hongos. Sin embargo, los niveles de micorrización fueron más bajos en las plantas inoculadas con *T. macrosporum*.

El grado de micorrización obtenido fue estadísticamente significativo ($F=9,60$; $p<0,001$). La micorrización encontrada en las plantas inoculadas con *T. macrosporum* osciló entre el 5% y el 70%, con una media del 19% ($\pm 24\%$). Las plantas inoculadas con *T. aestivum* y *T. uncinatum* alcanzaron niveles muy similares, situándose en el 46% ambas ($\pm 17\%$ y $\pm 14\%$, respectivamente), con rangos que oscilaron del 30% al 70% para ambas especies. La inoculación con *T. brumale* fue la que alcanzó una mayor grado de micorrización con el 62% de media ($\pm 18\%$). Las plantas presentaron unos rangos del 30% al 80%.

Tabla 4.1. Porcentajes finales de micorrización con diferentes especies de *Tuber* spp. (media $\pm$ desviación estándar, n=10). Los valores seguidos los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p<0,05$).

Especie	% Micorrización	
<i>T. macrosporum</i>	19 $\pm$ 24	b
<i>T. aestivum</i>	46 $\pm$ 17	a
<i>T. uncinatum</i>	46 $\pm$ 14	a
<i>T. brumale</i>	62 $\pm$ 18	a

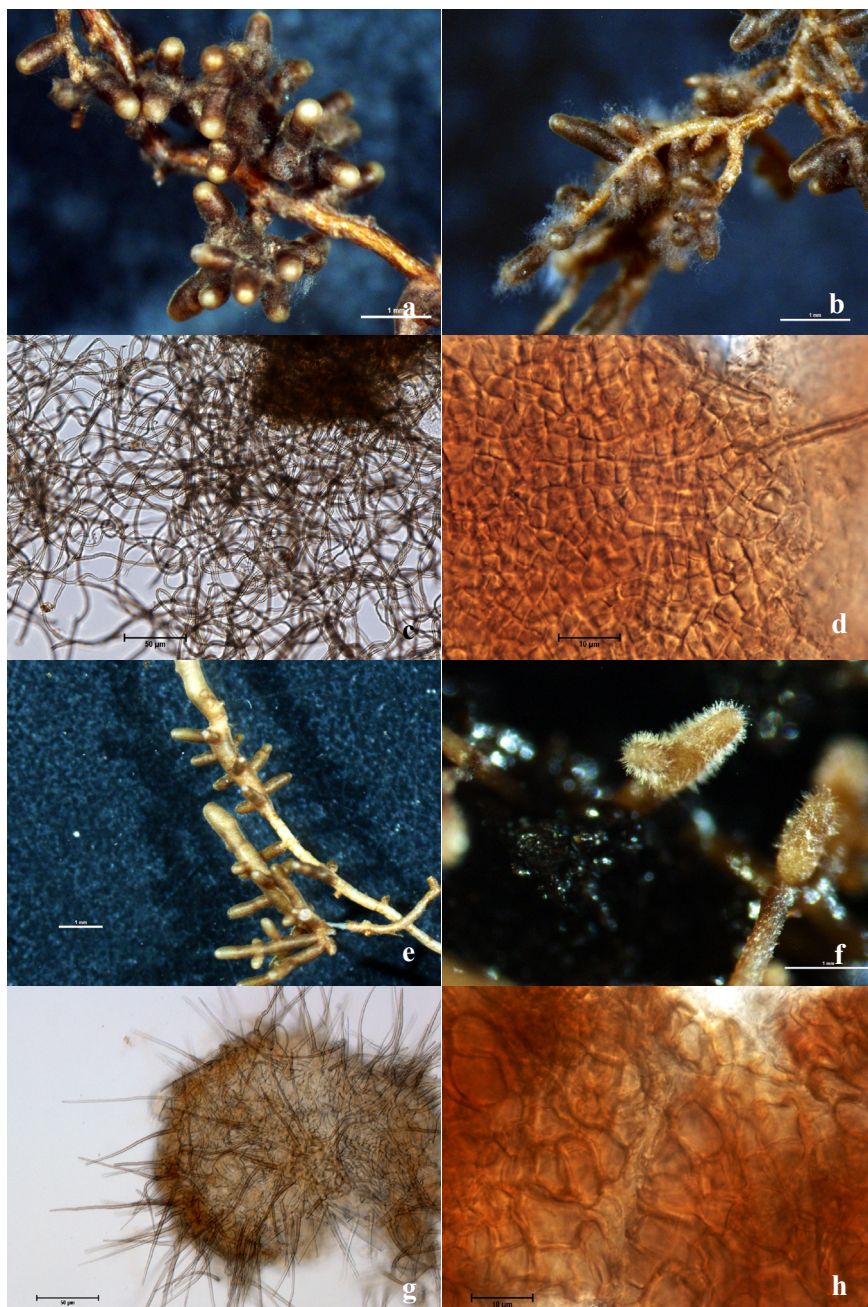


Figura 4.3. Micorrizas de *Tuber* spp. en *Castanea sativa*. **a-b)** Micorrizas de *T. aestivum*; **c)** manto de *T. aestivum* pseudoparenquimático con células angulares; **d)** cistidios de *T. aestivum*; **e-f)** micorrizas de *T. brumale*; **g)** cistidios de *T. brumale*; **h)** manto de *T. brumale* pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle.

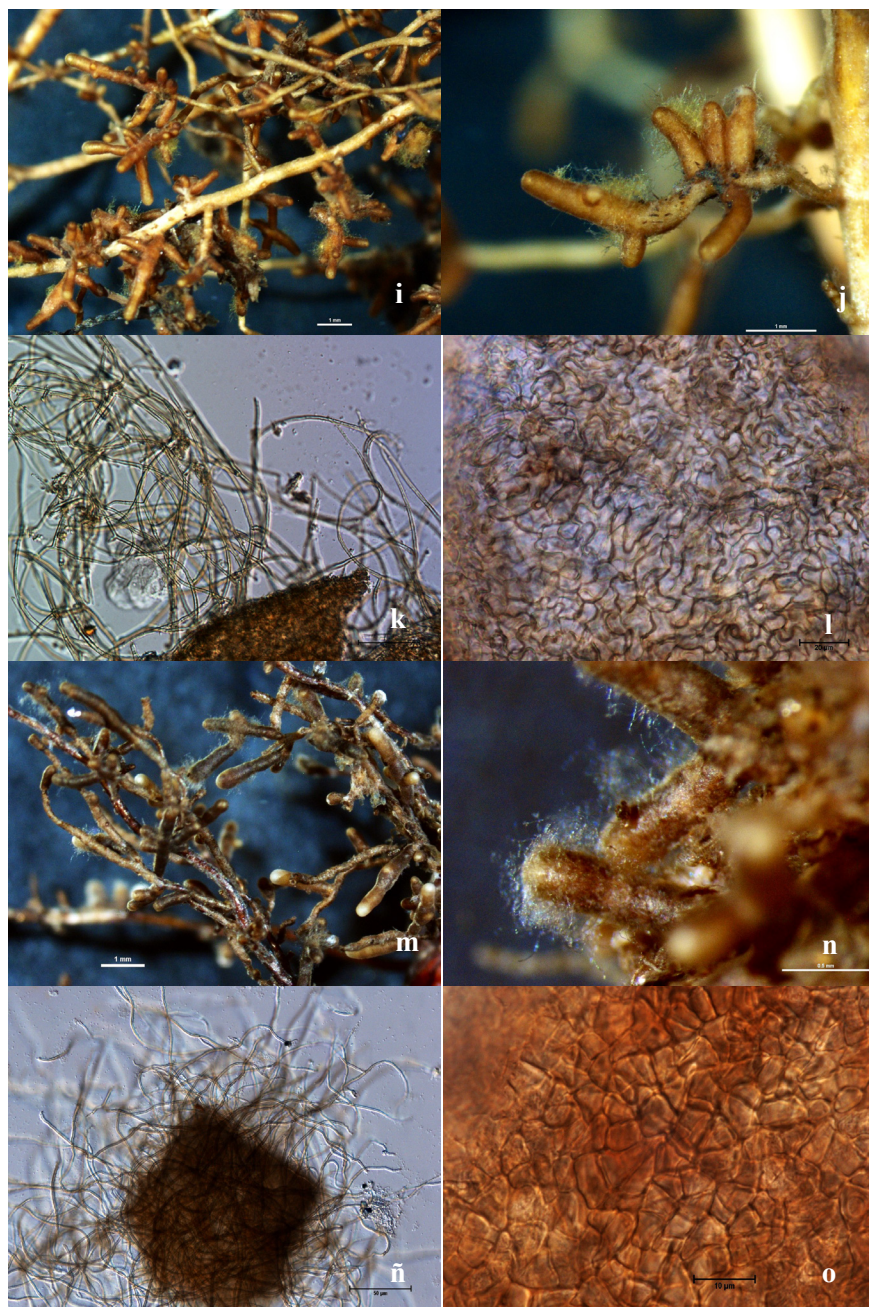


Figura 4.3 (continuación). Micorrizas de *Tuber* spp. en *Castanea sativa*. **i-j)** Micorrizas de *T. macrosporum*; **k)** cistidios de *T. macrosporum*; **l)** manto de *T. macrosporum* pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle; **m-n)** micorrizas de *T. uncinatum*; **ñ)** manto de *T. uncinatum* pseudoparenquimático con células angulares; **o)** cistidios de *T. uncinatum*.

4.3.2. Efecto de la micorrización de *Tuber sp.* sobre parámetros morfológicos y fisiológicos

Las plantas presentaron diferencias estadísticamente significativas en las variables morfológicas analizadas (Tabla 4.2). En altura, las plantas inoculadas con *T. brumale* y *T. aestivum* crecieron más que las plantas control, que a su vez alcanzaron una longitud de tallo mayor que las plantas micorrizadas con *T. uncinatum*, y *T. macrosporum*. El diámetro también presentó diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 4.2). Las plantas micorrizadas con *T. uncinatum* presentaban mayor diámetro en sus tallos, seguidas de las plantas control y las plantas en asociación simbiótica con *T. aestivum*, siendo las plantas con *T. macrosporum* y *T. brumale* las que tenían tallos con menor grosor.

La biomasa aérea reflejó variaciones dependiendo del tratamiento de micorrización evaluado (Tabla 4.2). Las plantas micorrizadas con *T. macrosporum* y *T. uncinatum* fueron significativamente más pequeñas que las plantas control o las plantas micorrizadas con *T. brumale*, mientras que las plantas con *T. aestivum* tenían una biomasa intermedia. La micorrización influyó positivamente al crecimiento del sistema radical de las plantas (Tabla 4.2). Así, las plantas control desarrollaron los sistemas radicales con menor biomasa, prácticamente a la par de las plantas micorrizadas con *T. macrosporum*. Las plantas de *T. uncinatum* formaron sistemas de tamaño intermedio, igual que las plantas micorrizadas con *T. aestivum*, aunque estas últimas tenían mayor biomasa radical. Las plantas que más sistema radical formaron fueron las micorrizadas con *T. brumale*. En resumen, las plantas de *T. brumale* desarrollaron más biomasa total que el resto, mientras que las plantas micorrizadas por *T. macrosporum* fueron las que menos crecieron.

Tabla 4.2. Efecto de la micorrización sobre los parámetros morfológicos analizados en 10 individuos de cada tratamiento transcurridos 18 meses desde la inoculación. Para cada columna, los valores seguidos de diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p < 0,05$).

Variable	Control	<i>T. macrosporum</i>	<i>T. aestivum</i>	<i>T. uncinatum</i>	<i>T. brumale</i>	Micorrización	
						<i>p</i>	<i>F</i>
Altura (cm)	36,1±5, ab 6	33,1±10,2 a	43,1±8,9 ab	34,1±6,6 a	45,1±8,9 b	<0,001	4,4
Diámetro (mm)	10,3±1, bc 6	9,6±1,1 ab	10,7±0,9 bc	11,5±2,2 c	8,1±0,8 a	<0,001	8,2
Peso seco raíz (g)	5,8±2,9 a	5,9±1,6 a	8,5±3,2 ab	7,0±2,9 ab	8,7±2,0 b	<0,05	2,9
Peso seco raíz (g)	8,7±3,3 b	4,5±1,7 a	7,1±2,3 ab	4,8±1,6 a	9,3±2,0 b	<0,001	9,7

Las mediciones de F_v/F_m al amanecer (Figura 4.4) no mostraron diferencias entre tratamientos ($H_{(4,50)}=5,86$; $p > 0,20$), y todas las plantas mostraron valores elevados ($F_v/F_m > 0,75$). En las

medidas realizadas a mediodía (Figura 4.5) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($H_{(4,50)}=16,60$; $p<0,005$). Las plantas de *T. brumale* tuvieron valores más elevados que el resto de tratamientos incluidos el control (Figura 4.5) o las micorrizadas con *T. macrosporum*. En las plantas micorrizadas con *T. aestivum* y *T. uncinatum* se midieron valores intermedios.

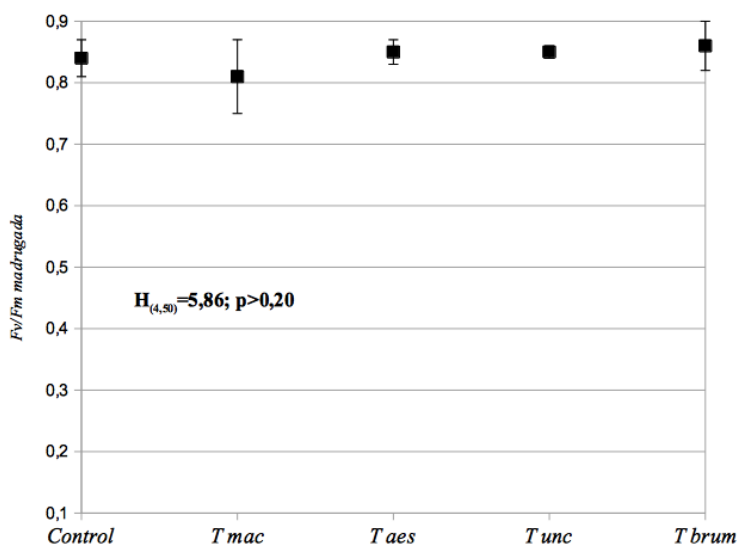


Figura 4.4. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al amanecer (relación F_v/F_m). Los cuadrados negros representan la media de los datos, mientras que los corchetes indican la desviación típica. Los valores seguidos de diferente letras son significativamente diferentes para el Test de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). *T mac*= plantas micorrizadas con *T. macrosporum*; *T aes*= plantas micorrizadas con *T. aestivum*; *T unc*= plantas micorrizadas con *T. uncinatum*; *T bru*= plantas micorrizadas con *T. brumale*.

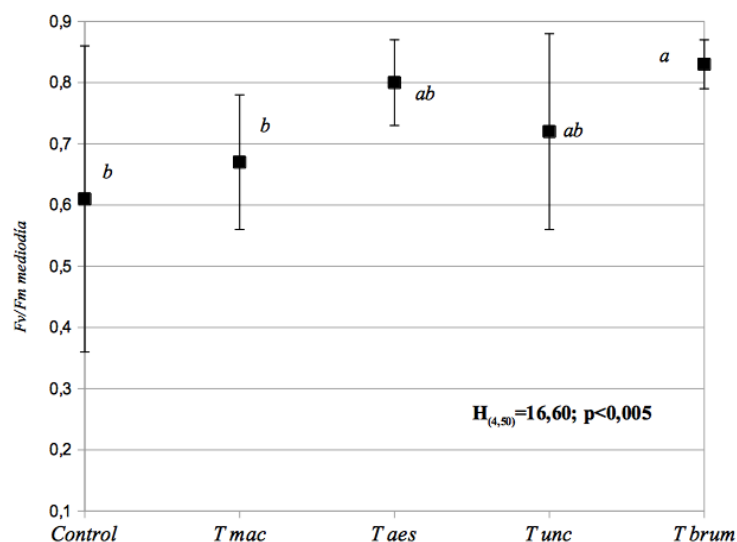


Figura 4.5. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al mediodía (relación F_v/F_m). Los cuadrados negros representan la media de los datos, mientras que los corchetes indican la desviación típica. Los valores seguidos de diferente letras son significativamente diferentes para el Test de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). *T mac*= plantas micorrizadas con *T. macrosporum*; *T aes*= plantas micorrizadas con *T. aestivum*; *T unc*= plantas micorrizadas con *T. uncinatum*; *T bru*= plantas micorrizadas con *T. brumale*.

La estimación del rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{II} , Figura 4.6), mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F=6,43$; $p<0,001$). Las plantas micorrizadas por *T. macrosporum* y *T. uncinatum* no se diferenciaban estadísticamente en el rendimiento cuántico del fotosistema II de las plantas control. En cambio, las plantas con *T. aestivum* tenían valores altos y significativamente mayores que los anteriores. Las plantas de *T. brumale* presentaron valores intermedios entre ambos grupos.

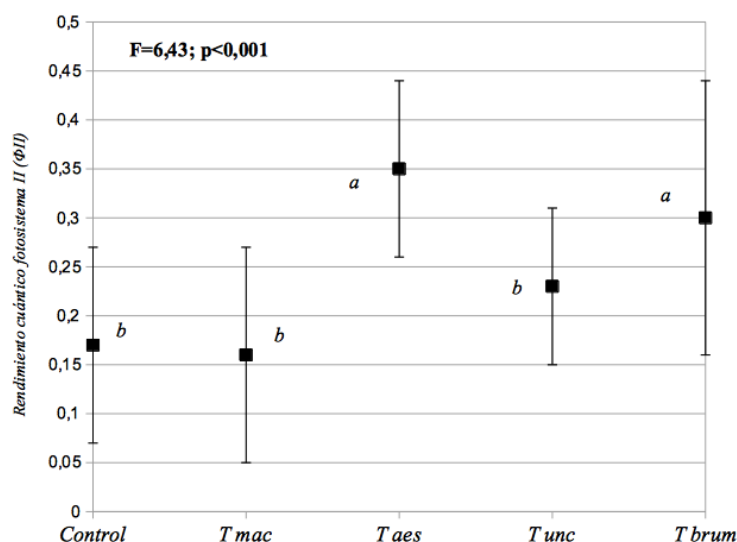


Figura 4.6. Valores medidos de rendimiento cuántico del fotosistema II Φ_{II} por tratamiento. Los cuadrados negros representan la media de los datos, mientras que los corchetes indican la desviación típica. Los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p<0,05$). *T mac*= plantas micorrizadas con *T. macrosporum*; *T aes*= plantas micorrizadas con *T. aestivum*; *T unc*= plantas micorrizadas con *T. uncinatum*; *T bru*= plantas micorrizadas con *T. brumale*.

El potencial hídrico de madrugada (Figura 4.7) en las plantas no distinguió diferencias entre tratamientos ($H_{(4,50)}=4,39$; $p>0,35$), estando más estresadas las plantas micorrizadas por *T. uncinatum*. A mediodía (Figura 4.8), todos los tratamientos presentaron potenciales hídricos más bajos (más negativos) que de madrugada. Se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, que fueron exclusivamente debidas a que las plantas micorrizadas con *T. brumale* tenían significativamente mayor potencial hídrico que el resto de tratamientos. Entre el resto de tratamientos no se observaron diferencias significativas, situándose los valores por debajo de $-2,0$ MPa.

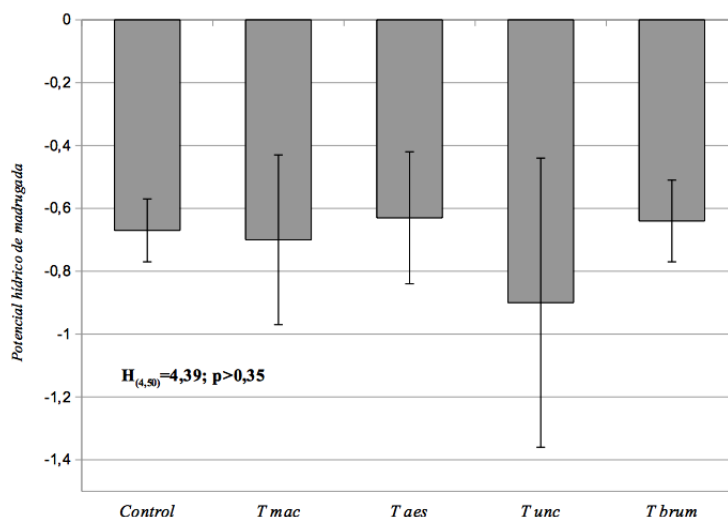


Figura 4.7. Potencial hídrico de madrugada por tratamiento de *Castanea sativa*. Las barras grises indican el valor medio de las mediciones, los corchetes señalan la desviación típica. Los datos seguidos con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). *T mac*= plantas micorrizadas con *T. macrosporum*; *T aes*= plantas micorrizadas con *T. aestivum*; *T unc*= plantas micorrizadas con *T. uncinatum*; *T bru*= plantas micorrizadas con *T. brumale*.

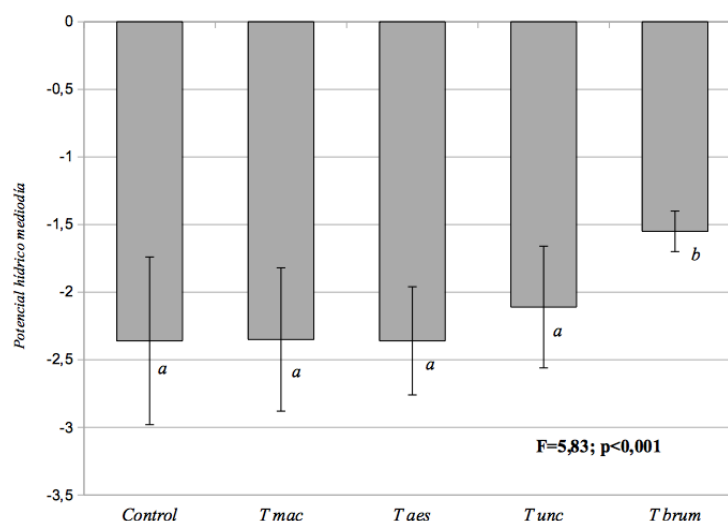


Figura 4.8. Potencial hídrico al mediodía por tratamiento de *Castanea sativa*. Las barras grises indican el valor medio de las mediciones, los corchetes señalan la desviación típica. Los datos seguidos de diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Tukey ($p<0,005$). *T mac*= plantas micorrizadas con *T. macrosporum*; *T aes*= plantas micorrizadas con *T. aestivum*; *T unc*= plantas micorrizadas con *T. uncinatum*; *T bru*= plantas micorrizadas con *T. brumale*.

4.4. Discusión

En algunos inventarios fúngicos publicados, se han localizado micorrizas de *Tuber* spp. asociadas a las raíces de castaños (Peintner et al. 2007; Blom et al. 2009; Rubio et al. 2006). En nuestro país, se ha constatado la fructificación de, al menos, una de las trufas ensayadas (*T. brumale*) asociada a *C. sativa* en Cataluña (Morcillo et al. 2015).

En este trabajo se ha demostrado que mediante técnicas comunes de inoculación controlada y producción en vivero las trufas ensayadas *T. macrosporum*, *T. aestivum*, *T. uncinatum* y *T. brumale*, de claro potencial económico, pueden formar ectomicorrizas con *C. sativa*. Esto supone un hito, porque es la primera vez que se han sintetizado en condiciones de vivero.

La importancia económica de la especie *T. macrosporum* es indudable, y en este trabajo se ha planteado su asociación con el castaño. Se han encontrado micorrizas de *T. macrosporum* en especies de las familias *Salicaceae* y *Fagaceae* (Benucci et al. 2012a), y se ha descrito la formación de micorrizas con robles, avellanos y carpes mediante inoculación espiral (Giovanetti y Fontana 1981; Granetti 1995; Vezzola 2005; Zambonelli et al. 1993; Benucci et al. 2012b). A pesar de ser una especie aún no encontrada en nuestro país, y a que la micorrización no ha sido abundante, podemos definir a *C. sativa* como un posible anfitrión de *T. macrosporum*. Los resultados obtenidos son similares a los descritos por Benucci et al. (2012b) en plantas de *Quercus robur* L., *Q. cerris* L. y *Corylus avellana* L.

La micorrización con *T. aestivum*, *T. uncinatum* y *T. brumale*, en cambio, formó abundantes ectomicorrizas en el castaño. *T. aestivum* y *T. uncinatum* han sido definidas como especies que micorrizan con facilidad en la bibliografía con diferentes especies como *Quercus pubescens*, *Q. ilex*, *Q. robur*, *Q. faginea*, *Corylus avellana* (Zambonelli y Govi 1983; Chevalier y Frochott 1990; Pruett 2008; Donnini et al. 2014). *T. brumale* ha formado micorrizas en ensayos realizados con *Pinus pinea*, *P. nigra*, *P. halepensis*, *Q. pubescens*, *Q. ilex*, *Q. robur*, *Tilia platyphyllos*, *Corylus avellana* (Chevalier 1973; Palenzona et al. 1972; Chevalier et al. 1975; Zambonelli et al. 1995; Zeppa et al. 2005). En ambos casos los niveles de micorrización encontrados han sido altos y la micorrización se puede considerar exitosa.

Además, la micorrización tuvo un efecto positivo en la biología de los plantones, lo que podría ser significativo a la hora de favorecer el desarrollo e implantación en campo (Villar-Salvador et al. 2012). Las plantas más micorrizadas conseguirían desarrollar más sus tejidos. Una parte aérea más grande permitiría una mayor producción de fotosintatos que conllevaría a un mayor crecimiento. Por contra, el gasto de agua sería mayor, debido a una mayor transpiración, que se vería contrarrestada por un sistema radical más desarrollado y una mayor captación de agua por acción del micelio. También la demanda de nutrientes sería mayor, pero la micorrización colaboraría con una mejor captación de la rizosfera.

Así, la micorrización afectó de manera diferencial la morfología de las plantas inoculadas. En general estimuló el desarrollo radical con respecto a las plantas control o a las plantas peor micorrizadas, como aquellas asociadas a *T. macrosporum*. Sin embargo, el efecto sobre el crecimiento de la parte aérea fue variable, dependiendo del hongo analizado. Los resultados son encontrados en otros trabajos coinciden con los observados en este, donde la inoculación ha

estimulado el desarrollo del sistema radical o la biomasa total de la planta (Bencivega y Venanzi 1990; Nardini et al 2000; Domínguez-Núñez et al. 2006).

Las plantas que más se desarrollaron en biomasa total fueron las colonizadas por *T. brumale*. Esto es llamativo, ya que se considera que *T. brumale* actuaría de manera semejante a *T. melanosporum* y que el uso de caliza activa estimulara la micorrización, el crecimiento del micelio y la fructificación de estas especies (Ricard 2003; Valverde-Asenso et al. 2009; García Montero et al. 2012). Así, estas especies de *Tuber* spp. utilizarían los compuestos del sustrato ricos en Ca para bombear masivamente este compuesto a las raíces. La consecuencia sería una intoxicación en las plantas que desembocaría en problemas nutricionales graves. La planta respondería estimulando y favoreciendo un mayor el crecimiento de las raíces. Esta respuesta estaría reflejada en los valores morfológicos medidos en las plantas de *T. brumale*.

A pesar de la presencia de Ca en el sustrato, y a que *C. sativa* está considerada una especie sensible a altas concentraciones de Ca (Flórez et al. 2001), las plantas micorrizadas aparentemente síntomas relacionados con deficiencias nutricionales a la luz de los resultados de la actividad del fotosistema II. Cuando el estrés se manifiesta, los valores de F_v/F_m pueden caer por debajo de 0,70 (Maxwell y Johnson 2000; Misra et al. 2001), valores que sólo se mostraron en los tratamientos control y en las plantas micorrizadas con *T. macrosporum*, con menor grado de micorrización. El deficit nutricional puede llevar en ambientes mediterráneos a dificultades de crecimiento, de manejo del agua, y amenazar la supervivencia, lo que se puede prevenir con un buen manejo de la fertilización en vivero (Jacobs et al. 2005; Oliet et al. 2009; Villar-Salvador et al. 2012).

Precisamente, la ausencia o el bajo nivel de micorrización podría haber tenido un efecto negativo en los tratamientos control y en las plantas micorrizadas con *T. macrosporum*, bien por problemas derivados de la incapacidad de las plantas para captar agua difícilmente alcanzable por sus raíces, o por problemas ligados a la nutrición, que el micelio de las ectomicorrizas ayuda a contrarrestar (Harley y Smith 1983; Bending y Read 1995; Griffiths y Cadwell 1992). Sin duda la fertilización aplicada durante el cultivo ha colaborado que estas posibles deficiencias no hayan sido muy importantes, aunque los mismos se hayan manifestado levemente en las mediciones de la actividad y el rendimiento del fotosistema II.

Las mediciones de potencial hídrico al mediodía reflejan una acción positiva de la micorrización en el estado hídrico de las plantas, con las plantas más micorrizadas (*T. brumale*) con mayor contenido de agua que las micorrizadas con *T. macrosporum* y que las plantas control, a pesar de que eran las plantas que mayor biomasa aérea habían desarrollado, lo que podría contribuir a tener una mayor pérdida de agua. La relación entre la micorrización con *Tuber* spp. y el estado hídrico de las plantas han sido estudiadas, concluyéndose que en situaciones de estrés hídrico,

sobre todo en verano, la micorrización puede mejorar el estado hídrico de las plantas (Domínguez-Núñez et al. 2006, 2008, 2009).

En resumen, la micorrización de *C. sativa* con *T. aestivum*, *T. uncinatum* y *T. brumale*, además de ser factible, no presentó problemas para la planta, mejorando su crecimiento y fisiología. La micorrización con *T. macrosporum* también se puede lograr, aunque habría que aumentar el conocimiento sobre esta trufa para mejorar los protocolos de cultivo y micorrización. Serían necesarios más estudios que ayuden a explicar las relaciones planta-hongo en el caso del castaño.

Capítulo 5

Efecto de la micorrización con *Tuber* spp. en el desarrollo de clones híbridos de castaño.

5.1. Introducción

El castaño, *Castanea sativa* Mill., es una especie muy valorada tanto por su producción de fruto como por la producción de madera. Una amenaza para estos aprovechamientos viene dada por la infección por *Phytophthora cinnamomi* Rands., que desencadena la aparición de la tinta del castaño. La tinta del castaño provoca la destrucción de las raíces secundarias, desde donde penetra en el tronco, produciendo la pérdida de yemas y defoliación hasta llegar a la muerte del árbol (Branzati et al. 1999). La aplicación de fungicidas ha constituido una estrategia de combate de la plaga cara e ineficaz, al mismo tiempo que puede perjudicar a hongos ectomicorrícicos (ECMM) que pueden colaborar en la nutrición de las plantas de castaño. Por ello, los esfuerzos de lucha contra la tinta se han centrado en la búsqueda de cultivares resistentes a la misma. Los resultados obtenidos han sido variables, debido principalmente a las características edáficas (Abreu et al. 1993).

Dadas las dificultades intrínsecas del castaño para producirse de forma asexual, con limitaciones en la formación de un sistema radical bien desarrollado (Miranda-Fontañá y Fernández López 1993), se han desarrollado técnicas de producción in vitro de materiales clonales resistentes a varias especies de *Phytophthora*. La hibridación con *Castanea crenata* Siebold & Zucc. ha sido una de las más exitosas por su resistencia a la tinta, pero su crecimiento es un handicap debido a su lentitud (Rocha Afonso 1990). Actualmente, las técnicas de multiplicación básicas para *Castanea sativa* son el cultivo in vitro de explantos y el estaquillado semileñoso (Fernández López et al. 2008).

Los procedimientos de cultivo in vitro del castaño son bien conocidos desde hace más de 30 años, con protocolos fiables y repetibles a partir de explantos (Vieitez et al. 1986; Chauvin y Salesses 1988; Miranda-Fontañá y Fernández López 1993). En general, para la multiplicación a partir de explantos se mantienen en cultivo en medio sólido enriquecido durante períodos variables hasta que se logra la elongación de los brotes. En ese momento se escinden y se transfieren a cámaras de cultivo para realizar el enraizamiento en bandejas de pequeño tamaño. Este proceso es variable, y puede durar de 4 a 8 semanas (Miranda y Fernández López 1992; Rodríguez et al. 2005). Posteriormente, se realiza la aclimatación, con una reducción paulatina de la humedad ambiental, y el cultivo en vivero.

La obtención de clones a partir de estaquillas semiherbáceas es un proceso económicamente más barato que a partir de explantos (Rodríguez et al. 2005). Las estaquillas cosechadas se

someten a un proceso de enraizamiento en túneles de cultivo con nebulización, durante unas 6 semanas. Una vez finalizada la fase de enraizamiento, se mantienen en vivero para realizar su cultivo durante un año (Fernández-López et al. 2001; Rodríguez et al. 2005).

El castaño es considerado una especie de crecimiento relativamente rápido con gran superficie foliar y elevada capacidad fotosintética (Ceulemans y Saugnier 1991). En ambientes mediterráneos, donde los suelos son pobres en nitrógeno (N,) existe una fuerte relación entre el aumento de la concentración de este macronutriente y el crecimiento y la supervivencia de distintas especies forestales. En condiciones de campo, concentraciones bajas de N en el suelo podrían provocar deficiencias nutricionales, que serían compensadas al aumentar la cantidad de raíces finas y de micorrizas que ayudarían a extraer nutrientes del terreno circundante (O'Neill et al. 1987; Kohen et al. 1992). El castaño se incluye dentro de las especies que pueden responder favorablemente a aumentos en la disponibilidad de nitrógeno. En ensayos de cultivo en vivero con microestaquillas -procedentes de cultivo in vitro- y macroestaquillas -procedentes de estaquillados semiherbáceos- Lario Leza et al. (2013) recomiendan dosis de 260 mg de N por planta durante el tiempo de cultivo en invernadero, independientemente de su obtención, para favorecer el desarrollo posterior de los individuos en campo.

La producción y comercialización de materiales forestales de reproducción se regula en nuestro país mediante el RD 289/2003. En el caso concreto del castaño, la selección de híbridos permite su uso en restauración o en conservación, así como en plantaciones semiindustriales para producción de madera. Los híbridos productores de castaña resistentes al chancro y a la tinta son regulados por el RD 895/2014, teniéndose en cuenta ambos reglamentos para los individuos producidos con la finalidad de obtención de madera y fruto. El uso de clones debe estar debidamente autorizado, tras la realización de los debidos ensayos que demuestren los caracteres necesarios y relevantes para la producción de madera, de fruto, y la resistencia a patógenos, así como la adaptación a plantaciones (Fernández López et al. 2008). Los principales caracteres, son el vigor y la rectitud de los troncos, la ramosidad y la dominancia apical, y la resistencia a *Phytophthora* spp. y *Chryphonectria parasitica*. También se hace necesario contrastar la resistencia a la sequía y la tolerancia al frío.

Se han realizado ensayos de resistencia y adaptabilidad de clones desarrollados en España (Miranda-Fontañá et al. 2005, 2007a, 2007b; Miranda-Fontañá y Fernández López 2013) en los que se concluye que no hay clones que sean totalmente resistentes a la infección por *Phytophthora* spp. y aunque pueden resistir razonablemente bien la sequía, están más adaptados a soportar el encharcamiento. De estos clones, se han seleccionado para este trabajo dos, el clon 16 y el clon 111, que han sido contrastados en diferentes ensayos para comprobar la facilidad de su multiplicación (Miranda-Fontañá y Fernández López 1993), la resistencia a la infección por este hongo patógeno (Miranda-Fontañá et al. 2005), su resistencia a la sequía o al

encharcamiento (Miranda-Fontaíña y Fernández López 2013), el vigor de las plantas producidas (Miranda-Fontaíña, 2007) o el coste de su producción en vivero (Rodríguez et al. 2005).

Los hongos ectomicorrícicos han sido postulados como una opción de control biológico frente a la infección por *Phytophthora* spp. (Blom et al. 2009), debido a la inhibición provocada por ciertas especies ectomicorrícicas sobre el crecimiento del patógeno (Branzati et al. 1999). Aún se discute sobre los mecanismos que pueden dar protección frente a patógenos: creación de barreras físicas, producción de antibióticos, uso del excedente de carbohidratos o mediante la estimulación de la producción de inhibidores del patógeno por parte del árbol (Zak 1964; Marx 1969a, 1969b, 1972).

En este contexto, los resultados de micorrización que se obtienen en general son variables y heterogéneos (Savoie y Largeau 2011). Además del efecto beneficioso indicado anteriormente sobre el control de la infección, la micorrización de plantas de *C. sativa* favorece el crecimiento tanto de la parte radical como de la parte aérea en individuos producidos a partir de semillas (Branzati et al. 1999). La micorrización de individuos micropropagados podría aumentar la capacidad de los procesos fotosintéticos y de respiración de las plántulas, permitiendo que sobrevivan y crezcan más que individuos no micorrizados, lo que ayudaría a superar problemas de aclimatación (Martins et al. 1996, 1997).

El género *Tuber* es un grupo de hongos ascomicetes muy apreciados por sus características organolépticas. Entre las más apreciadas, por orden, se encuentran *T. magnatum* Picco, *T. melanosporum* Vittad., *T. aestivum* Vittad., *T. macrosporum*, Vittad., *T. borchii* Vittad. y *T. brumale* Vittad.. Excepto *T. magnatum* y *T. macrosporum*, todas se recolectan de forma natural en la Península Ibérica. Las trufas se caracterizan por formar ectomicorrizas con un gran número de hospedantes, entre los que destacan especies arbóreas de la familia *Fagaceae*, pertenecientes sobre todo al género *Quercus*. Así, una de las ideas que se defienden desde hace años, es que la clonación de hospedantes de *Tuber* spp. podría mejorar la calidad de la micorrización controlada en vivero (Mamoun y Olivier 1996). Por otro lado, la producción de ascocarpos de *T. melanosporum* se ha relacionado con aumentos de calcio en el suelo y de cal activa (García-Montero et al. 2007b). *Castanea sativa* es uno de los anfitriones descritos para *Tuber* spp. (Zambonelli y Branzanti 1990; Pomarico et al. 2007), llegándose incluso a recomendar la instalación de plantaciones con diversidad de usos: maderero, frutal y fúngico (Benucci et al. 2012a). A pesar de tener dificultades para tolerar la presencia de cal activa en suelos, se han encontrado castaños micorrizados por trufa negra (Morcillo et al. 2015). También hay producciones puntuales de ascocarpos *T. borchii* y *T. brumale* asociados a castaños.

El objetivo de este capítulo es la producción en vivero de clones de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* micorrizados con diferentes especies de *Tuber* y evaluar los efectos de la micorrización sobre el crecimiento los mismos.

5.2. Material y Métodos

5.2.1. Producción de los clones

En las instalaciones de TRAGSA en Maceda (Ourense) se establecieron en agosto de 2012 explantos de dos clones de *Castanea sativa* x *Castanea crenata*. El clon 111 se caracteriza por ser una F2, más resistente a *Phytophthora* spp. y el clon 16 se caracteriza por ser una F1 con mayor resistencia al frío. Los explantos se multiplicaron como se describe en Rodríguez et al. (2005). La fase de enraizamiento se realizó en las instalaciones de Maceda. Los explantos con raíces incipientes se transplantaron a bandejas de 61 mL de volumen y de 40 alveolos (modelo A000549, Acudam, España), a una mezcla de turba:perlita (1:1); la perlita es mezcla de dos granulometrías (gruesa A134, y fina, B10). Se mantuvieron durante un mes en una caja truchera de porexpan tapadas con una lámina de policarbonato (con humedad a saturación) en cámara controlada a una temperatura de 25° C y humedad al 65%. Transcurridos dos meses después se retiró completamente la tapa y se trasladaron al CNRGF (Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales) “El Serranillo” donde se continuó el ensayo.

En marzo de 2013, 80 estaquillas de cada clon fueron transplantadas a bandejas 400 mL de capacidad de 32 alveolos (modelo 170/400, Plasnor, España); en cada bandeja se situaron 16 individuos de cada clon en dos grupos. Las bandejas se rellenaron con una mezcla de turba:perlita (80:20 en volumen); se utilizó turba Kekkila F6 y perlita de granulometría media.

La turba fue enmendada con dolomita cálcica al 90% para ajustar los valores de pH en función de la especie de *Tuber* considerada: pH 6 para las plantas control, pH 7 para las plantas inoculadas con *T. macrosporum*, pH 7.5 para *T. borchii*, pH 8 para *T. aestivum* y pH 8.5 para *T. melanosporum*.

5.2.2. Producción de inóculo. Inoculación

En mayo de 2013, tras un período de adaptación, se inocularon 16 plantas de cada clon con cada una de las especies de *Tuber* ensayadas. Las trufas utilizadas como inóculo tienen diferentes procedencias: *T. aestivum* Guadalajara, *T. borchii* de Grecia, *T. macrosporum* de Hungría y *T. melanosporum* de Teruel. Todos los carpóforos fueron confirmados macroscópicamente y microscópicamente (Figura 5.1). Se limpian y se desecan a 40° C hasta su uso. El protocolo de inoculación fue el descrito por Domínguez-Núñez et al. (2008). La mezcla se inyectó en los alveolos que habían sido previamente regados pero sin llegar a saturación, para evitar el percolado de las esporas. Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron unos días sin riego.

5.2.3. Cultivo en invernadero

A principios de junio de 2012, las plantas se trasladaron al invernadero para iniciar su cultivo. Las condiciones del invernadero fueron de 32° C de temperatura máxima y 4° C de temperatura mínima, con ausencia de sombreo durante el verano. Se realizó una fertirrigación semanal desde

junio hasta noviembre con fertilizante marca Hakaphos (BASF) de relación NPK 17-5-19 hasta un aporte al final del cultivo de 158 mg de N por planta y año.

El cultivo se mantuvo durante dos años en vivero, con el fin de asegurar la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas.

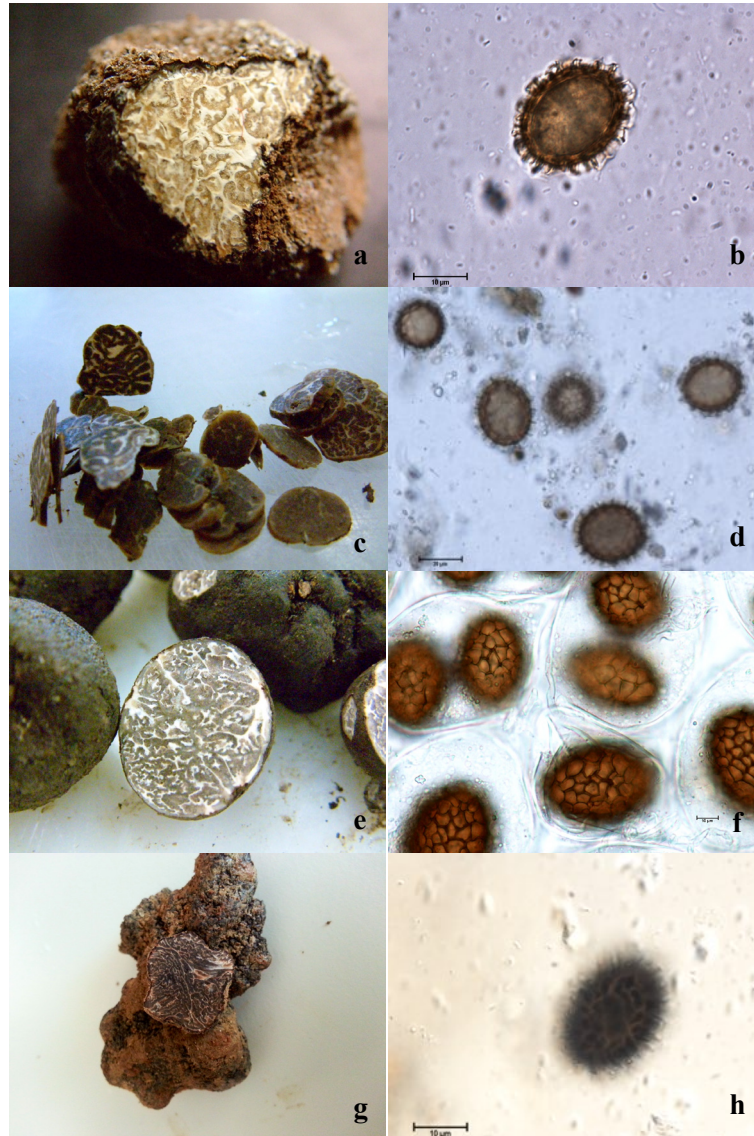


Figura 5.1. Inóculo de diferentes especies de *Tuber*. **a)** carpóforo de *T. aestivum*; **b)** esporas de *T. aestivum*; **c)** carpóforo de *T. borchii*; **d)** esporas de *T. borchii*; **e)** carpóforo de *T. macrosporum*; **f)** esporas de *T. macrosporum*; **g)** carpóforo de *T. melanosporum*; **h)** esporas de *T. melanosporum*

5.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorrización

Durante el segundo verano de cultivo, cuando se confirma la presencia de las primeras puntas micorrizadas, se realizaron las mediciones de fisiología en las plantas. Se seleccionaron 10 individuos por clon y tratamiento.

Se estimaron deficiencias nutricionales mediante la fluorescencia de la clorofila. Se midió el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II -relación de la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (Fv/Fm)- en plantas adaptadas a la oscuridad tanto en madrugada como al mediodía, y el rendimiento cuántico del fotosistema II, Φ_{II} , que estima la eficiencia del fotosistema II en iluminación (Maxwell y Johnson 2000). Se utilizó un fluorímetro (FSM, Hansatech). Se realizaron medidas de potencial hídrico de madrugada y al mediodía para evaluar diferencias de uso del agua de las plantas. Las mediciones se realizaron con una cámara de presión según los protocolos descritos en bibliografía (Scholander et al. 1964; Tyree y Hammel. 1972).

Al finalizar el cultivo (invierno de 2014) los cepellones se lavaron cuidadosamente y se estimó el grado de micorrización siguiendo la metodología descrita por Chevalier y Grente (1979). Las ectomicorizas se identificaron utilizando un estereomicroscopio (Nikon SMZ100) y un microscopio invertido (Nikon Ti-U). Las fotografías se realizaron con una cámara digital (Nikon DS-5Mc y DS-2Mv). La confirmación de los caracteres morfológicos y anatómicos de las micorrizas siguen a Agerer (1987-2012).

La confirmación molecular de las diferentes especies de *Tuber* se realizó mediante PCR por el IRTA (Investigación y Tecnología Agroalimentarias, Cabrils). Para la extracción de ADN genómico de las micorrizas se utilizó el producto DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Para la PCR se utilizaron los siguientes cebadores (en función de las especies diana a detectar): *T. aestivum*, cebadores Tu1sekvF/Tu1sekvF (Grynder et al. 2011); *T. borchii* cebadores TboI/TboII (Amicucci et al. 1998); *T. macrosporum* cebadores TmacrF/TmacrR (Benucci et al. 2011) y *T. melanosporum* cebador esMELF/MELFR (Douet et al. 2004). Se utilizaron dos controles positivos para cada especie obtenidos a partir de carpóforos identificados. Como control negativo se utilizó agua HPLC.

Las plantas se desecaron en una estufa durante 48 h a 60° C y se tomaron los datos morfométricos: altura (cm), diámetro (mm), y el peso seco de la parte radical y aérea (gr). Las plantas se molieron con un micromolino batidor Culati utilizando el tamiz de 2 mm para las analíticas de contenido nutricional. Las analíticas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) se realizaron en Nutrilab-URJC (Laboratorio de Compuestos Químicos y Nutrientes de muestras fisiológicas, farmacológicas y ambientales de la Universidad Rey Juan Carlos) según los protocolos de Radojevic y Bashkin (1999). Las analíticas de calcio (Ca) y hierro (Fe) se

realizaron en Departamento de Ingeniería y Gestión Forestal y Ambiental (Universidad Politécnica de Madrid) según los protocolos de Kalra (1997).

5.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA), de 2 factores: el clon con dos niveles, y el hongo micorrizado, con 5 niveles (control y cada una de las trufas ensayadas). Para reflejar diferencias entre tratamientos, se realizó el test de Tukey (significación para $p < 0,05$). En el caso de variables no cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad se utiliza el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o de Mann-Whitney. Se analizaron también relaciones entre las variables medidas mediante el test de correlación de Pearson. Se utilizó el paquete estadístico R (2013).

5.3. Resultados

5.3.1. Micorrizas y grado de micorrización

En todos los tratamientos realizados se observó micorrización de las diferentes especies de *Tuber* pero el grado de colonización fue pequeño y sobre todo el número de ápices no fue muy elevado. Hay que tener en cuenta también que los sistemas radicales no están muy desarrollados sobre todo en lo referente a sistema trófico.

El análisis molecular resultó positivo para las cuatro especies de *Tuber* en los dos clones (Figura 5.2).

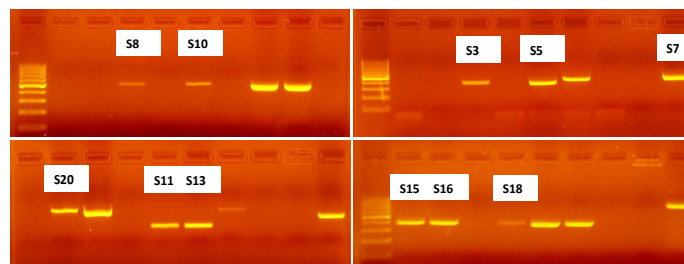


Figura 5.2. Resultados del análisis molecular de las ECM de *Tuber* sp. Fotografías con luz ultravioleta de los geles de agarosa. Los códigos se corresponden con los del IRTA: S8= *T. aestivum*, S3= *T. borchii*, S11= *T. macrosporum*, S18= *T. melanosporum*. Las bandas sin código corresponden a los controles positivos. Las bandas de la izquierda corresponden al marcador 100 bp ladder.

Morfológica y anatómicamente las micorrizas coinciden con las descritas con anterioridad para *Tuber aestivum* y *T. borchii* (Benucci et al. 2012c), *T. macrosporum* (Benucci et al. 2012b) y *T. melanosporum* (Pérez et al. 2007).

Los sistemas micorrícicos de *T. aestivum* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, engrosadas en la parte más distal, más raramente cilíndricas, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo amarillento a marrón oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta largos cistidios en el manto externo, simples, con forma de cerda o punzón, hialinos a amarillentos en micorrizas jóvenes, de ocre a marrón en micorrizas adultas. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático con células angulares (Figura 5.3a-d).

Las sistemas micorrícicos de *T. borchii* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración contacto. Las micorrizas son rectas, a veces algo curvadas, engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de amarillento a ocre oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta cistidios cortos en el manto externo, con forma de aguja, halinos y normalmente monoseptados, con verrugas en la superficie. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle, a veces redondeadas las paredes celulares engrosadas (Figura 5.3e-h).

Las sistemas micorrícicos de *T. macrosporum* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, cilíndricas pocas veces engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo amarillo a o marrón anaranjado. La micorriza adulta suele presentar el ápice blanquecino. Presenta largos cistidios en el manto externo, simples, con forma de cerda o punzón, amarillos en micorrizas adultas. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático, con células epidermoides que forman un puzzle (Figura 5.3i-l).

Las sistemas micorrícicos de *T. melanosporum* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, cilíndricas engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo claro a o marrón oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice más claro. La superficie del manto es lisa pero a veces aparece granulada. Presenta largos cistidios en el manto externo, hialinos que se ramifican en ángulo recto. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático, con células epidermoides que forman un puzzle (Figura 5.3m-o).

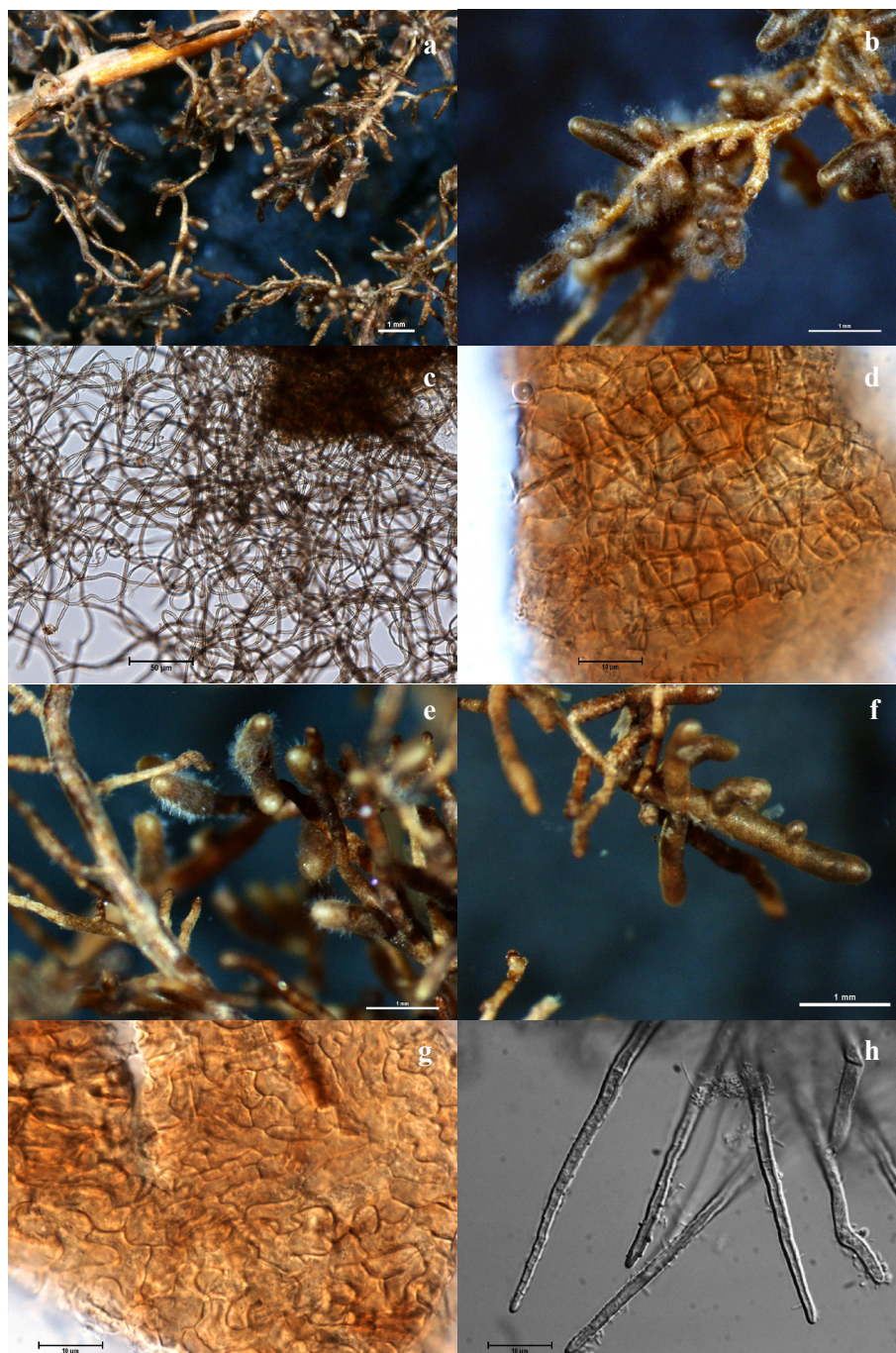


Figura 5.3. Micorrizas de *Tuber* spp. en clones de *C. sativa* x *C. crenata*. **a-b)** Micorrizas de *T. aestivum*; **c)** cistidios de *T. aestivum*; **d)** manto de *T. aestivum* pseudoparenquimático con células angulares; **e-f)** micorrizas de *T. borchii*; **g)** manto de *T. borchii* pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle; **h)** cistidios de *T. borchii*.

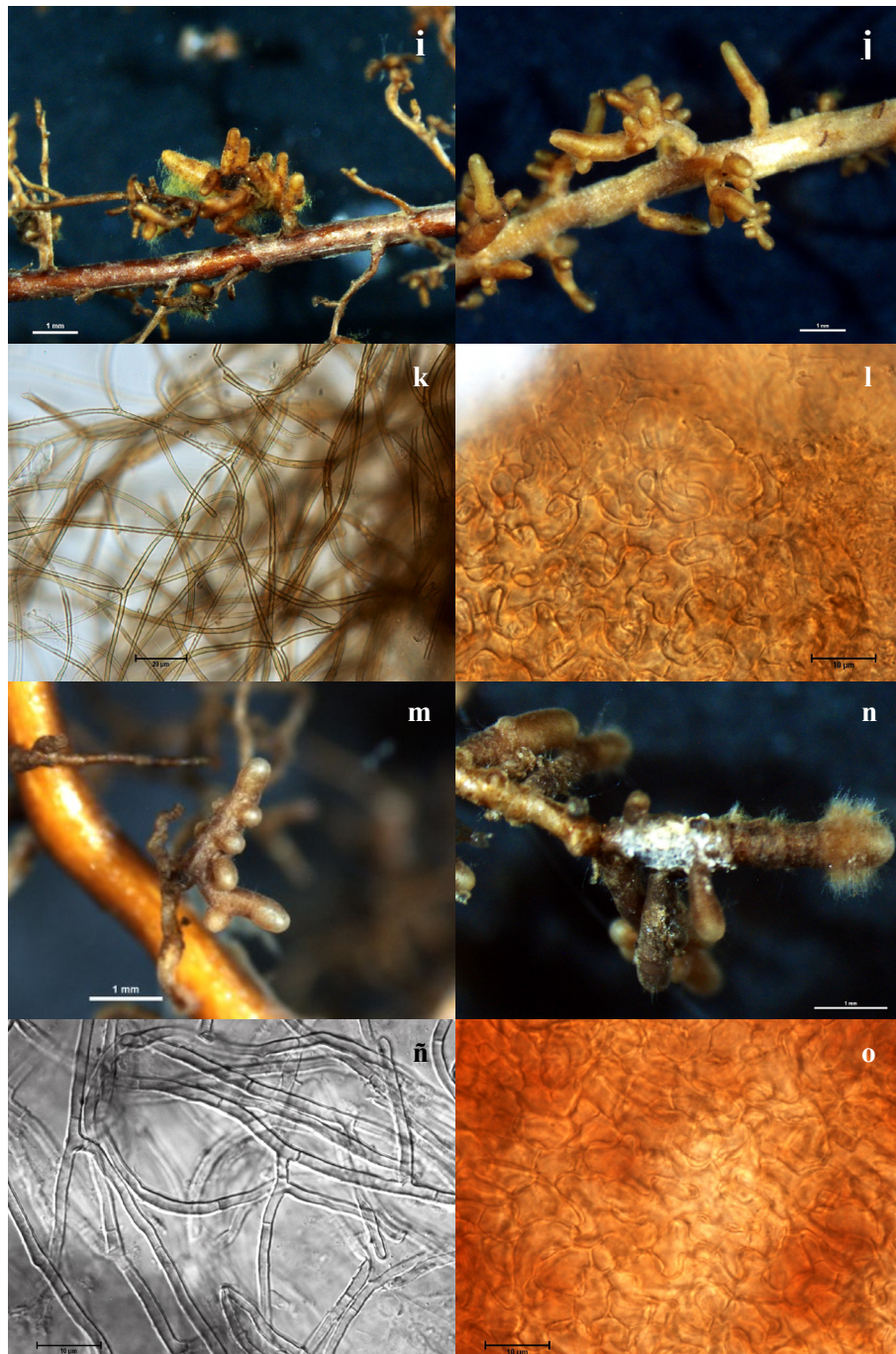


Figura 5.3 (continuación). Micorrizas de *Tuber* spp. en clones de *C. sativa* x *C. crenata*. **i-j)** Micorrizas de *T. macrosporum*; **k)** cistidios de *T. macrosporum*; **l)** manto de *T. macrosporum* pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle; **m-n)** micorrizas de *T. melanosporum*; **ñ)** cistidios de *T. melanosporum* con ramificación de 90°; **o)** manto de *T. melanosporum* pseudoparenquimático, con células epidermoides en forma de puzzle.

A pesar de que el clon 16 logró alcanzar niveles más elevados de micorrización que en el clon 111 (28 ± 31 % vs 18 ± 21 %), las diferencias no fueron significativas ($p > 0,10$). Los datos obtenidos muestran niveles estadísticamente significativos en el porcentaje final dependiendo del hongo inoculado ($H_{(3,68)} = 31,42$; $p < 0,001$), siendo mayor para *T. borchii*, seguido de *T. aestivum*, *T. melanosporum* y *T. macrosporum* (Tabla 5.1). La estimación del porcentaje final de puntas micorrizadas por *T. melanosporum* pudo estar perjudicado por el momento de análisis de la micorrización, poco favorable para esta especie. *T. macrosporum* no micorrizó bien, y en la mitad de las plantas analizadas, la presencia de este hongo fue puramente testimonial. El clon 16 se comportó de forma más receptiva a la micorrización de las diferentes especies de trufa ensayadas que el clon 111.

Tabla 5.1. Porcentajes de micorrización de las diferentes especies de *Tuber* en los dos clones híbridos (media $\pm$ error estándar, $n=10$). Los valores seguidos por asterisco son significativamente distintos para el Test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Clon	<i>T. borchii</i>	<i>T. macrosporum</i>	<i>T. aestivum</i>	<i>T. melanosporum</i>
16	60 $\pm$ 23	5 $\pm$ 14	30 $\pm$ 29	13 $\pm$ 27
111	33 $\pm$ 27	2 $\pm$ 5	19 $\pm$ 15	12 $\pm$ 17
Media	46 $\pm$ 12**	4 $\pm$ 13	25 $\pm$ 10	15 $\pm$ 12

5.3.2. Efecto de la micorrización de *Tuber* spp. sobre parámetros morfológicos y fisiológicos

Morfológicamente, el clon 111 desarrolló significativamente más diámetro ($4,3 \pm 0,3$ mm vs $3,8 \pm 0,4$ mm), peso seco de la parte aérea ($2,8 \pm 0,6$ g vs $1,9 \pm 0,5$ g) y del sistema radical ($2,5 \pm 0,3$ g vs $1,5 \pm 0,4$ g) que el clon 16 (Tabla 5.2). Los individuos del clon 111 también fueron más grandes en altura ($21,2 \pm 2,3$ cm) que los del clon 16 ($19,8 \pm 2,4$ cm), aunque no se encontraron diferencias significativas.

La micorrización afectó negativamente al desarrollo de la parte aérea tanto en altura como en biomasa de los clones (Tabla 5.2), aunque este efecto fue diferente según el clon que se analizara, apareciendo una interacción significativa entre el clon estudiado y la trufa inoculada. Así, el clon 16 creció significativamente menos si estaba asociado a *T. aestivum* o *T. melanosporum*, y el clon 111 se vio inhibido por la presencia de *T. borchii* o *T. macrosporum*.

Tabla 5.2. Efecto de la micorrización sobre los parámetros morfológicos analizados en 10 individuos de cada tratamiento transcurridos 18 meses desde la inoculación. Para cada columna, los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p < 0,05$).

Clon 16	Altura (cm)		Diámetro (mm)		Peso seco raíz (g)		Peso seco aéreo (g)	
Control	24,4±4,0	a	4,1±0,6	abc	2,1±0,9	ab	2,9±1,1	a
<i>T. borchii</i>	25,1±5,3	a	4,1±0,7	abc	2,3±1,0	ab	2,9±1,2	a
<i>T. macrosporum</i>	24,8±2,6	a	4,9±0,8	abc	1,9±1,6	ab	2,6±0,9	ab
<i>T. aestivum</i>	11,6±5,2	b	2,9±0,7	c	0,6±0,2	bc	0,7±0,5	c
<i>T. melanosporum</i>	13,1±6,6	b	2,9±0,8	c	0,5±0,2	c	0,7±0,7	c
Clon 111								
Control	29,1±5,0	a	4,8±0,6	a	3,1±0,9	a	4,1±1,1	a
<i>T. borchii</i>	16,8±5,6	b	2,9±0,8	c	0,9±0,7	bc	0,8±0,4	c
<i>T. macrosporum</i>	13,4±4,6	b	3,3±0,7	bc	1,0±0,4	bc	0,9±0,5	bc
<i>T. aestivum</i>	24,5±5,1	a	5,7±0,5	a	4,1±0,9	a	4,0±1,2	a
<i>T. melanosporum</i>	25,6±5,2	a	5,0±0,8	ab	3,3±1,0	a	4,0±0,9	a
Factor	p	F	p	F	p	F	p	F
Clon	0,24	1,4	<0,05	4,5	<0,01	7,6	<0,05	4,3
Hongo	<0,005	3,6	0,90	2,1	0,11	1,9	<0,01	3,7
Clon x Hongo	<0,001	11	<0,001	13,5	<0,001	7,3	<0,001	21,5

En todas las mediciones fisiológicas realizadas, las plantas control presentaron valores más elevados que las micorrizadas. Así, las plantas control presentaron mayor F_v/F_m (Figuras 5.4 y 5.5), tanto de madrugada ($H_{(4,88)}=43,15$; $p < 0,001$) como a mediodía ($F=7,67$; $p < 0,001$), aunque a mediodía todos los valores medidos indican pérdida de rendimiento fotosintético. No se encontraron diferencias significativas entre clones en el ratio F_v/F_m . Respecto a la influencia del hongo, las plantas micorrizadas con *T. macrosporum* presentaron valores más bajos, mientras que las plantas micorrizadas con *T. melanosporum* tenían los valores más elevados entre las que se habían asociado a alguna especie de *Tuber*.

En cuanto a Φ_{II} , de nuevo las plantas control presentaron mayor actividad frente a las micorrizadas, aunque la diferencia sólo fue significativa con las plantas micorrizadas con *T. macrosporum* ($H_{(4,88)}=16,87$; $p < 0,005$). La micorrización con *T. macrosporum* disminuyó los valores medios significativamente en las plantas analizadas con respecto al resto, mientras que las plantas con *T. borchii* lo vieron aumentado (figura 5.6). No se encontraron diferencias entre las plantas de un clon con respecto al otro.

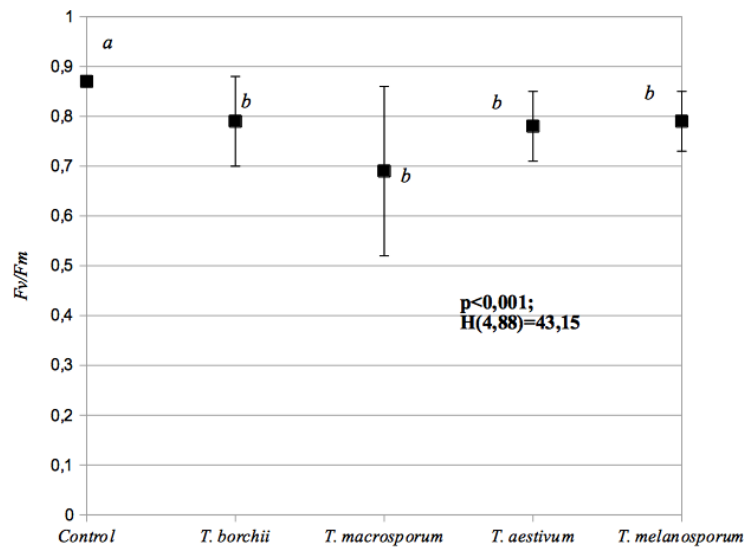


Figura 5.4. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al amanecer (relación F_v/F_m). Los cuadrados indican media de ambos clones, y los corchetes la desviación típica. Los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

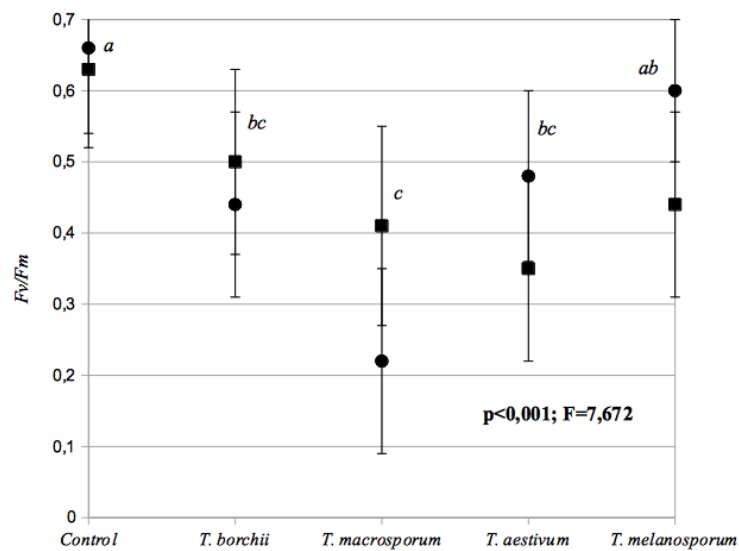


Figura 5.5. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al mediodía (relación F_v/F_m). Los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p < 0,05$). En círculos negros se presentan los valores medios para el clon 111, mientras que los cuadrados negros representan los valores medios para el clon 16, y los corchetes la desviación típica para cada clon.

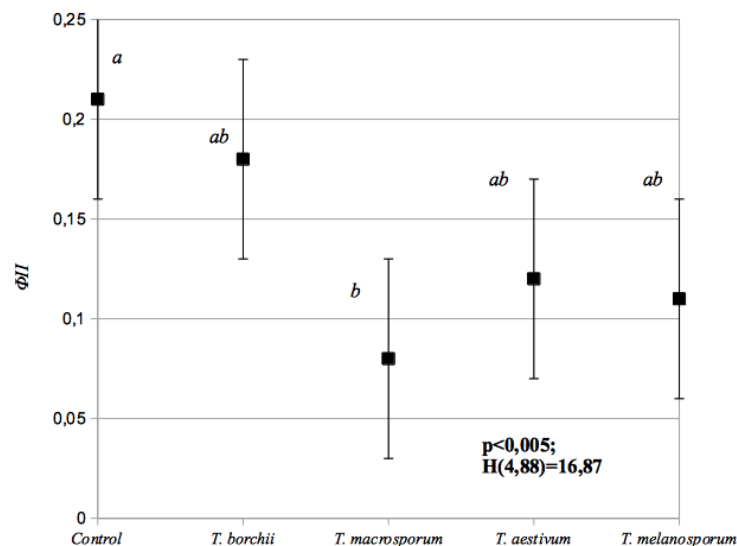


Figura 5.6. Efecto de la micorrización sobre el rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{II}). Los cuadrados indican media de ambos clones, y los corchetes la desviación típica. Los valores que muestran diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p<0,05$).

El potencial hídrico de madrugada de las plantas micorrizadas fue más bajo (más negativo) que el de las plantas individuos ($H_{(4,60)}=27,11$; $p<0,001$) (Figura 5.7) . Las plantas asociadas a *T. borchii* y *T. macrosporum* presentaban mayores niveles de estrés que las asociadas a *T. aestivum* o *T. melanosporum*, aunque las diferencias no fueron significativas.

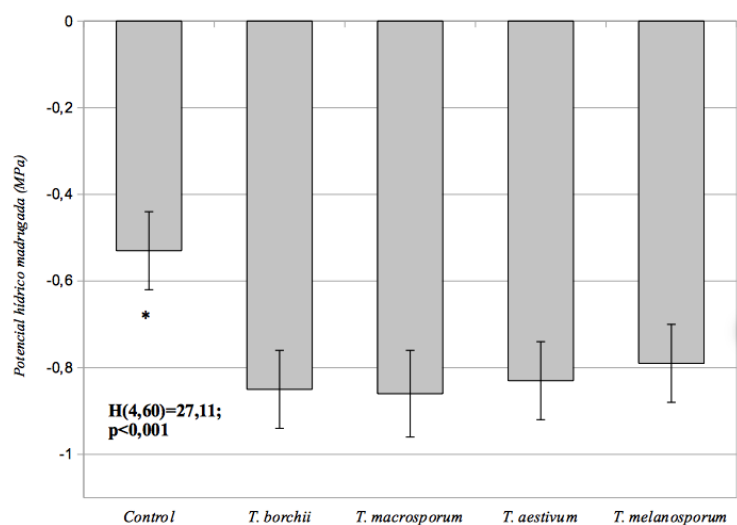


Figura 5.7. Potencial hídrico de madrugada por especie micorrizada de *Tuber* en clones de *Castanea sativa*. Las barras grises representan la media de ambos clones, y los corchetes la desviación típica. Los datos marcados con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

A mediodía, las diferencias se estrecharon ($H_{(4,88)}=10,32$; $p=0,035$), manteniéndose con mejor estatus hídrico las plantas control, y sin diferencias remarcables entre las micorrizadas (Figura 5.8). Ambos clones presentaban niveles de estrés hídrico semejantes ($Z=0,57$; $p>0,10$), encontrándose una tendencia a mejorar el estado hídrico en las plantas del clon 111 micorrizadas con *T. aestivum* y *T. melanosporum* (Figura 5.9).

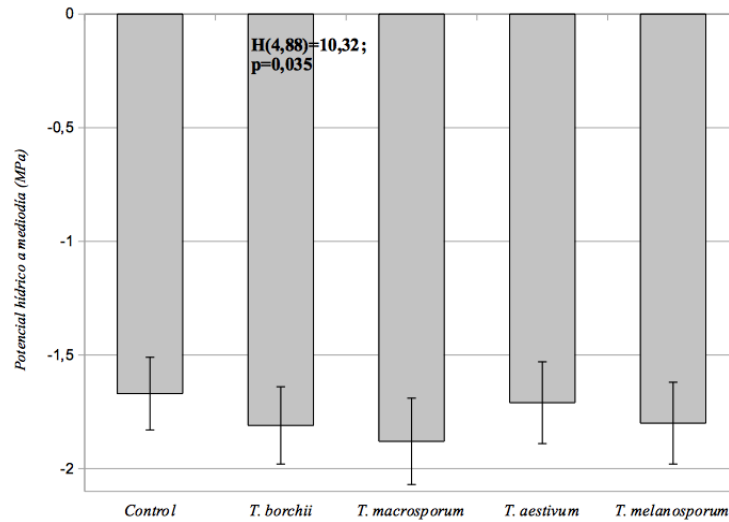


Figura 5.8. Potencial hídrico a mediodía por especie micorrizada de *Tuber* en clones de *Castanea sativa*. Las barras grises representan la media de ambos clones, y los corchetes la desviación típica. Los datos marcados con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

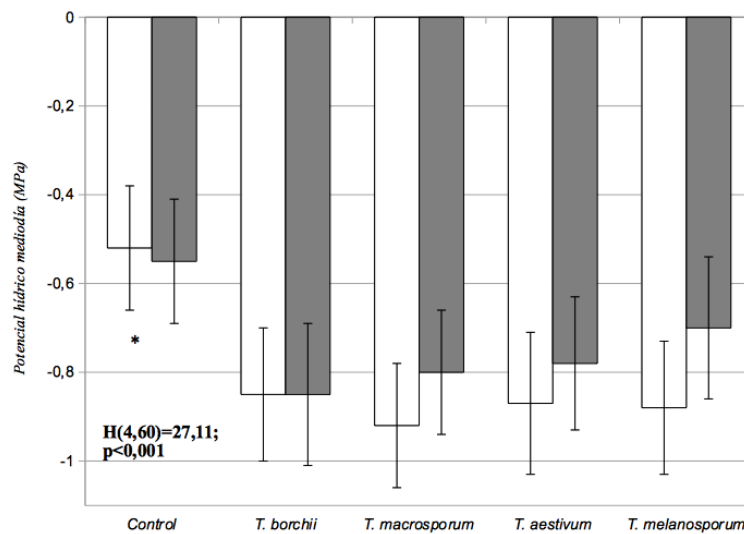


Figura 5.9. Comparativa de potencial hídrico al mediodía, por clones y especie micorrizada de *Tuber* clones de *Castanea sativa*. En blanco, media para el clon 16, en gris media para el clon 111. Los corchetes reflejan la desviación típica. Los datos marcados con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Mann-Whitney ($p<0,05$).

La concentración de nutrientes fue diferente dependiendo de la parte analizada, sistema radical o la parte aérea (Tabla 5.3). Así, en la parte aérea se acumuló más N ($F=2,47$; $p=0,1$), P ($F=6,56$; $p<0,05$) y K ($Z=-2,14$; $p<0,05$) que en la parte radical. La concentración de Fe y Ca fue similar en parte aérea y radical. Las plantas del clon 16 concentraron más N ($F=13,99$; $p<0,001$), P ($F=8,92$; $p<0,005$) y Ca ($F=8,83$; $p<0,005$) que las plantas del clon 111, aunque no K ($Z=-0,10$; $p>0,1$) o Fe ($F=0,15$; $p>0,1$). Las diferencias más evidentes entre ambos clones vinieron dadas por la mayor acumulación de N en la parte aérea de las plantas del 16 frente a las del 111 ($F=21,96$; $p<0,001$).

Tabla 5.3. Concentración de N, P y K (mg/g) en parte aérea y radical para cada clon. Los valores seguidos de asterisco indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) para el test de Tukey o de Mann-Whitney.

Clon	N (mg/g)		P (mg/g)		K (mg/g)		Fe (mg/g)		Ca (mg/g)	
	Parte aérea	Parte radical	Parte aérea	Parte radical	Parte aérea	Parte radical	Parte aérea	Parte radical	Parte aérea	Parte radical
16	9,2±1,3 **	7,7±0,8	1,3±0,2	0,8±0,2	3,1±1,2	2,2±1,3	0,1±0,1	0,2±0,2	11,5±0,9	11,3±1,2
111	6,8±0,9	6,8±0,7	0,9±0,2	0,8±0,1	1,8±0,5	1,9±0,4	0,1±0,1	0,1±0,1	9,8±2,0	10,8±1,4

La micorrización favoreció el estado nutricional de las plantas (Tabla 5.4), aumentando significativamente la concentración de N ($F=4,26$; $p<0,005$) y P ($F=2,69$; $p<0,05$). Las plantas asociadas a *T. borchii* aumentaron la asimilación de K, este efecto puede deberse a una mayor actividad de esta especie con respecto a otras, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa ($H_{(4,90)}=1,89$; $p>0,10$). La asimilación de Fe también se vio fortalecida por la presencia de hongos micorrícicos ($F=12,03$; $p<0,001$), al igual que la absorción de Ca ($F=9,70$; $p<0,001$). Además, en el caso del Fe y del Ca, se encontraron interacciones entre clon y hongo, donde el clon 16 inoculado con *T. melanosporum* absorbe significativamente mayor cantidad de Fe ($F=7,30$; $p<0,001$) y de Ca ($F=18,29$; $p<0,001$) que el resto de tratamientos.

El porcentaje de micorrización influyó positivamente ($r=0,48$; $p<0,005$) en la relación F_v/F_m medida a primera hora de la mañana (Tabla 5.5). La concentración de Ca se correlacionó positivamente con la cantidad de N ($r=0,56$; $p<0,001$), P ($r=0,58$; $p<0,001$) y Fe ($r=0,39$; $p<0,02$). La concentración de Fe favoreció la acumulación de K ($r=0,40$; $p<0,02$) y N ($r=0,37$; $p<0,03$). La relación más importante se dio entre N y P ($r=0,86$; $p<0,001$), donde existió una relación positiva entre la concentración de ambos nutrientes.

Tabla 5.4. Concentración de N, P y K (mg/g) y de Fe (%) y Ca (%) por especie de *Tuber* micorrizado. Los valores seguidos de distinta letra indican diferencias estadísticamente significativas para el test de Tukey o de Kolmogorov-Smirnoff ($p < 0,05$).

Tratamiento	N (mg/g)		P (mg/g)		K (mg/g)		Fe (mg/g)		Ca (mg/g)	
Control	5,9±0,7	a	0,7±0,1	a	2,1±0,5	a	0,05±0,02	c	8,8±1,3	a
<i>T. borchii</i>	8,8±1,2	b	1,1±0,2	b	3,50±1,8	a	0,15±0,03	ab	11,8±1,1	b
<i>T. macrosporum</i>	8,0±1,3	b	1,1±0,3	ab	1,9±0,5	a	0,09±0,02	b	11,6±1,0	b
<i>T. aestivum</i>	7,5±1,2	ab	0,9±0,2	ab	1,6±0,4	a	0,08±0,03	c	10,2±1,7	ab
<i>T. melanosporum</i>	8,0±1,3	b	1,0±0,3	ab	2,1±1,3	a	0,21±0,12	a	11,9±1,0	b

Tabla 5.5. Principales relaciones encontradas entre variables analizadas según el análisis de correlación de Pearson, para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Variables	p	Coefficiente de Pearson
% Micorrización Tuber app x F_v/F_m Mañana	$<0,005$	$r=0,48$
N_{total} (ppm) x P_{total} (ppm)	$<0,001$	$r=0,86$
Ca_{total} (%) x N_{total} (ppm)	$<0,001$	$r=0,56$
Ca_{total} (%) x P_{total} (ppm)	$<0,001$	$r=0,58$
Ca_{total} (%) x Fe_{total} (%)	$<0,02$	$r=0,39$
Fe_{total} (%) x K_{total} (%)	$<0,02$	$r=0,40$
Fe_{total} (%) x N_{total} (ppm)	$<0,03$	$r=0,37$

5.4. Discusión

El desarrollo de la micosilvicultura ha experimentado un empuje importante en los últimos años. El interés por favorecer la producción de carpóforos de hongos ectomicorrícicos comestibles en bosques más o menos controlados es todo un desafío (Savoie y Largeteau 2011). En este desafío, la truficultura, entendida como el manejo de plantaciones forestales en los que se ha logrado la micorrización con especies del género *Tuber*, es la punta de lanza. Así, se ha logrado de manera más o menos constante la producción de trufas en condiciones controladas, principalmente de *Tuber melanosporum*, aunque no exclusivamente.

En este trabajo se ha micorrizado por primera vez los clones de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* números 16 y 111 con las especies de *Tuber borchii*, *T. macrosporum*, *T. aestivum* y *T. melanosporum*. Todas ellas son descripción de nuevas síntesis micorrícicas en vivero.

De las especies testadas con clones de castaño, podemos considerar que la micorrización con *T. borchii* y *T. aestivum* ha alcanzado niveles satisfactorios, semejantes a otros alcanzados en otros ensayos (Benucci et al. 2012c). Los niveles de micorrización con *T. macrosporum* o *T. melanosporum* son bajos, aunque en el primer caso son semejantes a los descritos en otros trabajos (Benucci et al. 2012b). Por tanto, se puede añadir que la micorrización con *T. macrosporum* presenta algunos problemas aún pendientes de resolución.

Las plantas vieron disminuido su crecimiento al ser micorrizadas por las especies de *Tuber* spp. Este resultado es contrario a otros publicados en los que se ha trabajado con clones de castaño, en los que la micorrización tuvo un efecto beneficioso para las plantas (Branzanti et al. 1990; Martins et al. 1996). Esto puede tener dos posibles explicaciones. La primera estaría relacionada con el momento en el que se aplicaron los hongos micorrícicos, durante etapas iniciales de la inducción radical en los trabajos anteriormente señalados, o una vez finalizada la aclimatación y previo a la producción en vivero en nuestro estudio. La segunda sería el efecto de la fertilización nitrogenada aplicada durante este ensayo, cercana a la descrita como necesaria para una buena producción en vivero de clones (Lario Leza et al. 2013), en contraste con los trabajos anteriores, en los que no se describe aplicación de nutrientes a los clones. Así, en otros trabajos en los que se ha combinado micorrización y fertilización, aparecen interacciones frecuentemente, siendo atribuidas la disminución del crecimiento a la gran cantidad de carbohidratos que el hongo demanda para la formación de la simbiosis (Parladé et al. 2003; Hilzszanska et al. 2008; Rincón et al. 2007; Díaz et al. 2010).

Este último efecto de demanda de fotosintatos por parte del hongo micorrícico podría verse apoyado por las medidas realizadas en la funcionalidad del aparato fotosintético, concretamente en el funcionamiento del fotosistema II. Así, los valores de F_v/F_m sugieren una pérdida de eficiencia fotosintética por fotoinhibición, y no serían representativos de deficiencias nutricionales entre tratamientos. Pero los valores de F_v/F_m por la mañana, no representan daños en el aparato fotosintético, encontrándose en todos los tratamientos valores por encima o alrededor de 0,8, excepto para las plantas asociadas con *T. macrosporum*, siendo generalmente asumido que caídas en las mediciones en la madrugada estarían relacionadas con procesos fotoinhibitorios en respuesta a daños por altas temperaturas o estrés hídrico (Gamon y Pearcy 1989; Epron et al. 1992). Estos valores en general no están relacionados con estrés (Maxwell y Johnson 2000). A mediodía, el ratio F_v/F_m refleja estrés en todas las plantas medidas, lo que puede ser debido a la incapacidad de las plantas para tolerar el estrés producido por las altas temperaturas a mediodía en verano, que podrían dañar el aparato fotosintético (Maxwell y Johnson 2000). La disminución del valor Φ_{II} puede sugerir que las plantas están sufriendo estrés

hídrico, y la primera respuesta sería el cierre de estomas que tendría como consecuencia una bajada de la concentración interna de CO₂ en la hoja, limitando la carboxilación (Maxwell y Johnson 2000). Este proceso se produjo en todos los tratamientos a la vez, y fue más evidente en las plantas micorrizadas con *T. macrosporum*.

Además, las mediciones de potencial hídrico realizadas apoyarían esta respuesta encontrada en el funcionamiento del fotosistema II y por tanto en la demanda de carbohidratos. Si bien sí existen diferencias en madrugada, lo cual viene a indicar que el equilibrio con el sustrato es diferente, y que las plantas parten de diferentes niveles de humedad en el mismo, siendo las plantas control las que mejor estatus hídrico presentan, igualándose la situación a mediodía. Así, los niveles de humedad son semejantes en todas las plantas. Se ha encontrado en algún trabajo que las plantas micorrizadas pueden sufrir menores niveles de conductancia hidráulica en raíces, que se vería compensado por una mayor productividad de raíces finas para proveer de mayor cantidad de agua a la planta (Nardini et al. 2000). Esto podría explicar las diferencias obtenidas en el contenido de humedad en madrugada, que refleja un mayor nivel de estrés para las plantas micorrizadas.

La asimilación de nutrientes, que fue mayor en todas las plantas micorrizadas con *Tuber* spp., podría explicarse por una mayor demanda de nutrientes por parte de los hongos con respecto al control o bien por una capacidad de captación de nutrientes de la rizosfera. Así, en todos los nutrientes analizados, excepto en K, se encontraron mayores acumulaciones en las plantas micorrizadas, sobre todo en aquellos relacionados con la actividad fotosintética, como son el N, el P y el Fe. Así, es frecuente que el mayor contenido de N se relacione en ambientes mediterráneos con una mayor productividad, crecimiento y resistencia al estrés (Villar-Salvador et al. 2004, 2012). En el caso de K no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, y como sugieren algunos autores, la micorrización con *T. melanosporum* podría limitar la absorción de K (Domínguez Núñez et al., 2006; Suz et al. 2010), lo que según estos resultados, podría ser extensible a otras especies del género *Tuber*.

En cuanto al Ca, la mayor acumulación en plantas micorrizadas coincide con lo descrito para el resto de nutrientes. Se ha descrito el efecto positivo de la presencia de cal en el sustrato para el desarrollo del micelio y la producción de carpóforos de *T. melanosporum* (García-Montero et al. 2007b, 2009), insinuándose que un posible modelo de micorrización para esta especie sería provocar deficiencias nutricionales en la planta hospedante que podría favorecer la micorrización y crecimiento del micelio. En este ensayo podríamos asumir este mismo proceso a plantas micorrizadas con *T. borchii* y *T. macrosporum*, si bien en este último caso los beneficios de la simbiosis no pueden ser constatados por los bajos niveles de micorrización alcanzados. Este efecto además no funcionaría con la micorrización con *T. aestivum* (García-Montero et al. 2007b), que en este ensayo presenta contenidos en Ca similares a las plantas control no micorrizadas con *Tuber* spp.

En definitiva, la micorrización con especies de *Tuber* (*T. borchii*, *T. macrosporum*, *T. aestivum* y *T. melanosporum*) de clones de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* es factible, si bien el resultado depende de las características intrínsecas del clon micorrizado. La nutrición de los clones además se ve favorecida con la simbiosis, aunque el crecimiento se ve mermado posiblemente por el efecto sumidero que provoca la demanda de fotosintatos por parte del hongo. La fisiología de los clones no se ve afectada negativamente por la micorrización. Se hacen necesarios nuevos estudios que analicen la viabilidad de la relación simbiótica en campo, así como los efectos de las diferentes especies de *Tuber* en la nutrición y fisiología de las plantas, especialmente aquellos relacionados con el metabolismo del calcio y del potasio en los hospedantes.

Capítulo 6

Micorrización de *Castanea sativa* Mill. con *Tuber melanosporum* Vittad.

6.1. Introducción

La producción de hongos ofrece mayores retornos económicos que cualquier otro producto forestal en muchos bosques mediterráneos (García Montero et al. 2007). En estas áreas, las trufas (*Tuber Micheli* ex Wiggers) son los hongos que producen los mayores beneficios económicos. *Tuber melanosporum* Vittad. (Pezizales, Ascomycota) es un hongo ectomicorrícico comúnmente conocido como trufa negra, cuyos cuerpos fructíferos son reconocidos mundialmente por su valor gastronómico, representando un mercado importante y en auge en el que los precios medios se sitúan alrededor de los 400 euros/kg para el recolector. Es una especie que naturalmente se distribuye por las zonas mediterráneas de España, Francia e Italia. Su interés despertó en los últimos años del siglo pasado el desarrollo de plantaciones de árboles micorrizados con este hongo, apoyados por la Política Agraria Comunitaria de la Unión Europea (Reyna 2007).

La trufa negra es una especie de gran interés por sus posibilidades de comercialización debido a sus características gastronómicas. La producción de trufa negra de forma natural disminuyó a finales del siglo XX (Reyna 2000; Morcillo et al. 2015) debido principalmente a cambios de uso y modificación del hábitat donde se recolectaba, marcados por el abandono rural. En los últimos años se ha ratificado una posible tendencia a la disminución en las áreas más al sur de Europa ligada al cambio climático por aumento de temperaturas y disminución de precipitaciones (Büntgen et al. 2012).

La diversificación de plantaciones truferas es una asignatura aún pendiente. Existen unas cuantas razones de diversa índole para favorecer esta diversificación, entre las que destacaríamos la prevención de enfermedades y la promoción de una mayor diversidad biológica (Fabbio et al. 2003; Jactel et al. 2006; Cortina et al. 2006; Prévosto et al. 2011). Además, la fenología diferencial de las especies, en este caso desde un punto de vista productivo, aumentaría la cantidad de carbohidratos disponibles para que *T. melanosporum* realizara sus procesos reproductivos con mayores garantías.

La biología de *T. melanosporum* ha sido objeto de muchas revisiones debido a que su conocimiento puede ayudar a maximizar la producción de ascocarpos en las plantaciones truferas realizadas (García Montero 2007; Reyna 2000). De hecho, en los últimos años, empujados por los avances en las técnicas de detección molecular, se han podido determinar claramente la dependencia entre la fructificación de las trufas y de los fotosintatos producidos por el árbol anfitrión (Le Tacon et al. 2013). Así, la trufa funcionaría como un sumidero de carbono que tardaría algunos meses en ser retranslocado desde su asimilación por la planta. Esta

transferencia viene marcada por la fenología del árbol ya que estará relacionada con la bajada de temperaturas. Además, la capacidad de fijación de carbono determinaría la cantidad de reservas acumuladas por el árbol en sus tejidos y por tanto la disponibilidad de los mismos para el hongo tras ser hidrolizados (Le Tacon et al. 2013).

La necesidad de mantener una alta productividad fotosintética por parte del árbol conlleva una fuerte demanda de nutrientes y de agua, limitante en los ecosistemas mediterráneos. Las micorrizas pueden mejorar la adaptación y tolerancia a condiciones ambientales estresantes (Garbaye 2000; Di Pietro et al. 2007; Goltapeh et al. 2008), además de favorecer la nutrición de la planta (Domínguez-Núñez et al. 2006, 2008, 2009). Estas acciones se intentan explicar por diferentes mecanismos: por un efecto paralelo por una mayor adquisición de fósforo y una mejora nutricional de la planta (Augé et al. 1986; Domínguez-Núñez 2009); por una mejor absorción de agua, debido a la expansión del micelio (Ruiz-Lozano y Azcón 1995), al aumento efectivo de la conductividad hidráulica (Safir et al. 1971; Nardini et al. 2000) o por modificación de la arquitectura de la raíz (Miller et al. 1997); mediante cambios hormonales (Goicoechea et al. 1995; Duan et al. 1996); o mejora de la capacidad de retención de agua en el suelo (Domínguez-Núñez, 2009). Además, siguiendo la teoría de García-Montero et al. 2009, el hongo podría utilizar el calcio existente en el suelo para intoxicar a las plantas situadas en el radio de acción del micelio, estrategia que le permitiría aumentar su grado de micorrización, y eliminar la competencia herbácea, definiendo el famoso “quemado”.

Castanea sativa Mill. tiene especial interés en los programas de micorrización debido a su extendido uso en plantaciones por la calidad de su madera, a su capacidad para el recepado, y por su producción de frutos comestibles. Además, se ha descrito como productor de trufas de varias especies de *Tuber* spp. (*T. borchii*, *T. aestivum*, *T. brumale* y *T. melanosporum*) en zonas umbrías con suelos de pH neutro o escasamente alcalinos en ausencia de quemados claramente definidos (Morcillo et al. 2015). En la actualidad, el 90% de las plantaciones son realizadas con *Quercus ilex* (Morcillo et al. 2015), y se plantea el reto de diversificar las especies utilizadas en truficultura, para lo que el castaño será una excelente opción.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) evaluar la posibilidad de producción en vivero de planta de *C. sativa* micorrizada con *T. melanosporum*; (2) evaluar el efecto de la micorrización y del calcio en la morfología y fisiología del castaño.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Producción de plántulas

En febrero de 2013, semillas de *Castanea sativa* de procedencia ES02 (Galicia interior) se esterilizaron en superficie con una solución al 5% de hipoclorito sódico durante 30 min. Se

sembraron en bandejas con turba rubia (Kekkila F0, Finlandia) y se colocaron en una cámara de germinación (Incubig, Selecta, España) a 20 °C hasta su germinación. Tras la emergencia de la raíz, cuando el tamaño estaba en torno a 3 cm de longitud, las castañas fueron transferidas a 4 bandejas de 400 mL de capacidad con 32 alveolos (190/400, Plasnor, España). Dos de las bandejas se rellenaron con una mezcla de turba:perlita -la perrita era de 0-10 mm de grosor- (80:20 en volumen), mientras que las otras 2 se rellenaron de una mezcla de turba:piedra caliza molida (80:20 en volumen). Se utilizó turba Kekkila F6 enmendada con dolomita cálcica al 90% hasta alcanzar un pH=8 -adecuado para el cultivo de *Tuber melanosporum*, García-Montero et al., 2009— y perlita de granulometría media. La piedra caliza estaba comercializada por Tricalsa (Trimicex, 98% CaCO₃, granulometría de 1 mm de diámetro)

6.2.2. Producción de inóculo. Inoculación

En abril de 2013, se inoculó una bandeja de cada sustrato quedando la otra bandeja como plantas control. En total se inocularon 64 plantas. Todas las trufas (procedencia Teruel) adquiridas para producir inóculo esporal fueron confirmadas macróscopica y microscópicamente (Figura 6.1). La inoculación se desarrollo siguiendo el protocolo de Domínguez-Núñez et al. 2008.

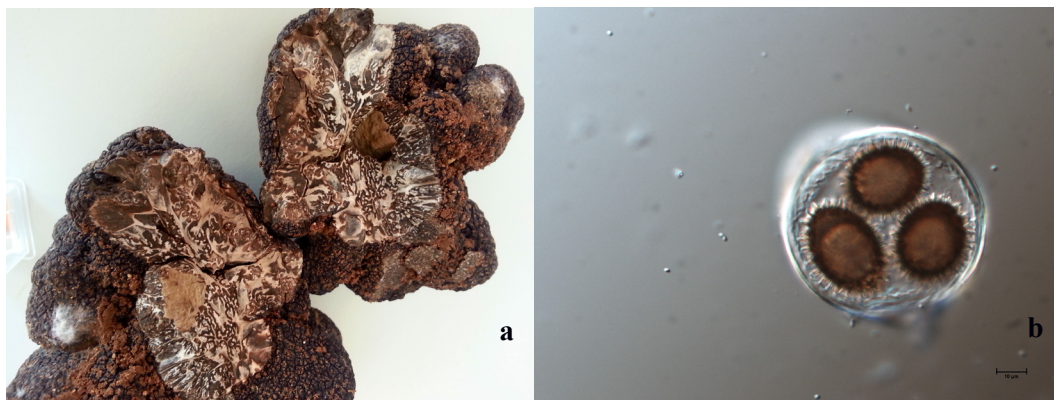


Figura 6.1. Inóculo de *Tuber melanosporum*: a) carpóforos; b) esporas.

6.2.3. Cultivo en invernadero

A principios de mayo de 2013, las plantas se trasladan al invernadero para iniciar su cultivo. Las temperaturas del invernadero fueron de 32° C de máxima y de 4° C de mínima y no se sombreó durante el verano. Se realizó una fertirrigación semanal desde junio hasta noviembre con fertilizante marca Hakaphos (BASF) de relación NPK 17-5-19 hasta un aporte al final del cultivo de 120 mg de N por planta y año.

6.2.4. Evaluación de parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas y grado de micorrización

El cultivo se mantuvo durante dos años en vivero, con el fin de asegurar la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas. Durante el segundo verano, tras confirmarse visualmente la micorrización, se realizaron mediciones de fisiología en las plantas. Se seleccionaron 10 individuos por clon y tratamiento. Se estimaron deficiencias nutricionales mediante el uso de la fluorescencia de la clorofila. Para ello se midió el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II -relación de la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m)- en plantas adaptadas a la oscuridad de madrugada y al mediodía, y el rendimiento cuántico del fotosistema II, Φ_{II} , que estima la eficiencia del fotosistema II en iluminación (Maxwell y Johnson 2000). Se utilizó un fluorímetro FSM (Hansatech). Se realizaron medidas de potencial hídrico para evidenciar diferencias entre tratamientos en su estado hídrico. Las mediciones se realizaron de madrugada y al mediodía con una cámara de presión, utilizando los protocolos descritos en Scholander et al. (1964).

Al finalizar el cultivo (invierno de 2014) los cepellones se lavaron cuidadosamente y se estimó el grado de micorrización siguiendo la metodología descrita por Chevalier y Grente (1979). Las ectomicorrizas se identificaron utilizando un estereomicroscopio (Nikon SMZ100) y un microscopio invertido (Nikon Ti-U). Las fotografías se realizaron con una cámara digital (Nikon DS-5Mc y DS-2Mv). La confirmación de los caracteres morfológicos y anatómicos de las micorrizas siguen a Agerer (1987-2012).

La confirmación molecular de las micorrizas de *T. melanosporum* se realizó mediante PCR por el IRTA (Investigación y Tecnología Agroalimentarias, Cabrils). Para la extracción de ADN genómico de las micorrizas se utilizó el producto DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Para la PCR se utilizaron los cebadores MELF/MELFR (Douet et al. 2004). Se utilizaron dos controles positivos obtenidos a partir de carpóforos identificados. Como control negativo se utilizó agua HPLC.

Se tomaron los datos morfométricos, altura de la parte aérea y diámetro del cuello de la raíz y posteriormente las plantas se desecaron en una estufa durante 48 h 60° C y se midió el peso seco de la parte radical y aérea. Las plantas se molieron en un molino de cuchillas Retsch SM-1, utilizando el tamiz de 2 mm para las analíticas de contenido nutricional. Las analíticas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) se realizaron en Nutrilab-URJC (Laboratorio de Compuestos Químicos y Nutrientes de muestras fisiológicas, farmacológicas y ambientales de la Universidad Rey Juan Carlos) según los protocolos de Radojevic y Bashkin (1999). Las analíticas de calcio (Ca) y hierro (Fe) se realizaron en Departamento de Ingeniería y Gestión Forestal y Ambiental (Universidad Politécnica de Madrid) según los protocolos de Kalra (1997).

6.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizadas con el test de Shapiro-Wilk para confirmar la hipótesis de normalidad de los datos ($\alpha=0,05$). Se chequearon los datos mediante el test de Levene ($p=0,05$) para confirmar los criterios de homocedasticidad. Para obtener diferencias significativas entre las variables morfológicas y fisiológicas muestreadas en los dos tipos de sustrato utilizados (turba/perlita vs turba/piedra) y los dos tratamientos de micorrización (planta inoculada frente a planta control) se realizó un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA). Las diferencias entre medias se discriminaron mediante el test de Tukey ($p<0,05$). Cuando la variable no cumplía las condiciones para la realización del ANOVA, se transformó. Si a pesar de ello los datos no cumplían las exigencias para la realización del test, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). El grado de micorrización se analizó mediante un test T de Student ($p<0,05$).

6.3. Resultados

6.3.1. Micorrizas y grado de micorrización

Morfológica y anatómicamente las micorrizas coinciden con las descritas con anterioridad para *T. melanosporum* (Pérez et al. 2007) (Figura 6.2). El análisis molecular confirmó la presencia de *T. melanosporum* (Figura 6.3).

Las sistemas micorrícos de *T. melanosporum* presentan ramificación simple, o monopodial pinnada o monopodial piramidal (Figura 6.3) y tipo de exploración corta distancia. Las micorrizas son rectas, cilíndricas engrosadas en la parte más distal, con terminaciones redondeadas. El color es muy variable en función del grado de desarrollo de la micorriza: de pardo claro a o marrón oscuro. La micorriza adulta suele presentar el ápice más claro. La superficie del manto es lisa pero a veces aparece granulada. Presenta largos cistidios en el manto externo, hialinos que se ramifican en ángulo recto. Los cistidios se distribuyen por toda la superficie del manto pero son más abundante en la zona media apical. El manto externo es pseudoparenquimático, con células epidermoides que forman un puzzle.

Tuber melanosporum formó ectomicorrizas con las plantas producidas (Tabla 6.1) tanto en el sustrato turba/perlita como en el sustrato turba/piedra (47 ± 23 % vs 49 ± 22 %), no encontrando diferencias estadísticamente significativas ($t=-0,25$; $p=0,80$). Los rangos de micorrización en las plantas producidas en turba/perlita oscilaron entre el 15-60 %, mientras que las producidas en turba/piedra se situaban entre 20-90%. La media de micorrización entre los dos tratamientos es aproximadamente un 50% (48 ± 17 %).

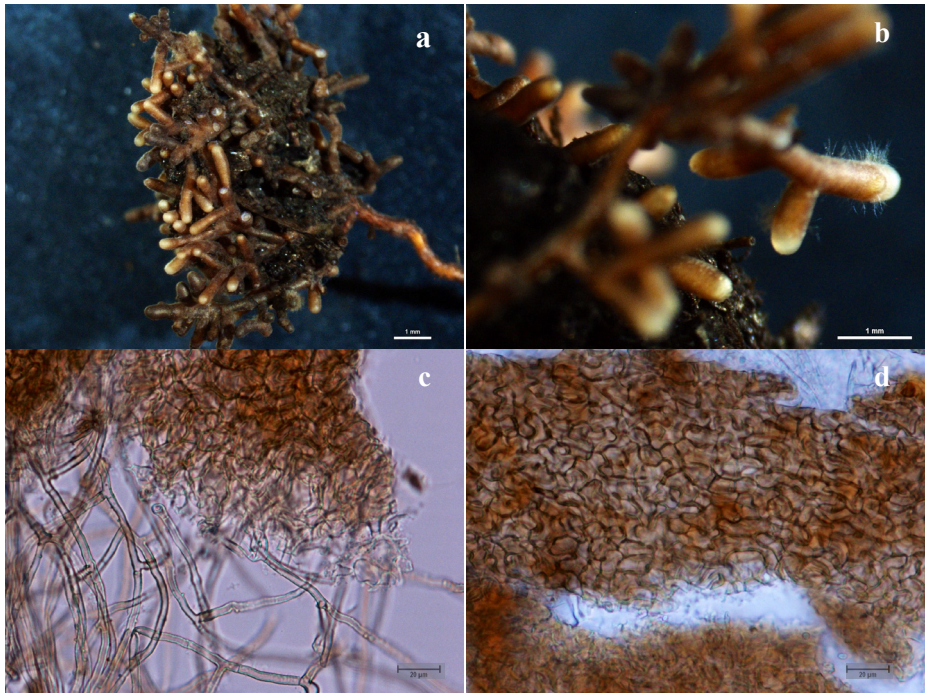


Figura 6.2. Micorrizas de *Tuber melanosporum* en *Castanea sativa*: **a-b)** micorrizas de *T. melanosporum*; **c)** cistidios de *T. melanosporum* ramificándose en ángulo recto; **d)** manto de *T. melanosporum* pseudoparenquimático con células epidermoides en forma de puzzle.

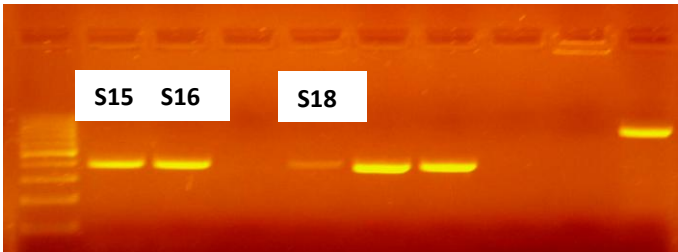


Figura 6.3. Resultados del análisis molecular de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum*. Fotografía con luz ultravioleta del gel de agarosa. Los códigos se corresponden con los del IRTA: S15= *T. melanosporum*. Las bandas sin código corresponden a los controles positivos. Las bandas de la izquierda corresponden al marcador 100 bp ladder.

Tabla 6.1. Porcentajes finales de micorrización con *Tuber melanosporum* dependiendo del sustrato empleado (media± error estándar, n=10). Los valores seguidos por asterisco son significativamente distintos para el Test de Student (p<0,05).

Tratamiento	Grado de micorrización de <i>T. melanosporum</i> (%)
Sustrato Turba/perlita	47±23
Sustrato Turba/piedra	49±22
Media	48±17

6.3.2. Efecto de la micorrización de *Tuber sp.* sobre parámetros morfológicos y fisiológicos

En comparación con el cultivo en turba/perlita, el cultivo en turba/piedra afectó negativamente de manera significativa al diámetro ($6,91 \pm 0,53$ mm vs $8,06 \pm 0,31$ mm para turba/piedra y turba/perlita, respectivamente) y al peso seco de la parte aérea ($6,65 \pm 0,66$ g vs $9,31 \pm 0,56$ g para turba/piedra y turba/perlita, respectivamente) (Tabla 6.2). Las plantas cultivadas en turba/piedra también tuvieron alturas medias más bajas ($34,98 \pm 7,05$ cm vs $39,82 \pm 8,65$ cm) y menor desarrollo radical ($6,66 \pm 3,65$ g vs $9,31 \pm 7,65$ g) que las cultivadas en turba/perlita, aunque las diferencias no fueron significativas. La micorrización afectó positivamente al crecimiento en altura de las plantas, independientemente del sustrato utilizado (Tabla 6.2). Las plantas micorrizadas cultivadas en turba/piedra desarrollaron sistemas radicales de mayor biomasa que el resto de tratamientos. En el sustrato turba/perlita las plantas tenían medias más altas en diámetro y en peso seco radical y aéreo si no estaban asociadas a *Tuber melanosporum*.

Tabla 6.2. Efecto de la micorrización sobre los parámetros morfológicos analizados en 10 individuos de cada tratamiento transcurridos 18 meses desde la inoculación. Para cada columna, los valores seguidos de diferente letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p < 0,05$).

Variable	Sustrato Turba/perlita				Sustrato Turba/piedra				Micorrización		Sustrato		Micorrización x Sustrato	
	Control		<i>T. melanosporum</i>		Control		<i>T. melanosporum</i>		<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>
Altura (cm)	35,9±7,4	ab	43,8±8,0	a	31,6±7,1	b	38,4±7,6	ab	<0,05	4,21	0,19	1,83	0,89	0,20
Diámetro (mm)	8,2±0,9	a	8,0±0,8	a	6,3±0,82	b	7,5±0,9	ab	0,25	1,39	<0,02	6,27	0,12	2,52
Peso seco raíz (g)	8,4±1,9	ab	8,2±1,6	ab	5,6±1,8	b	9,1±0,9	a	0,07	1,39	0,30	6,27	<0,05	2,52
Peso seco raíz (g)	9,5±2,0	a	9,1±2,0	a	5,7±1,5	b	7,6±1,9	ab	0,44	0,62	<0,01	7,91	0,24	1,46

Las mediciones de F_v/F_m (Figuras 6.4 y 6.5) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Las medidas realizadas de madrugada no reflejaron diferencias ni entre sustratos ($p > 0,10$), ni por la influencia de *T. melanosporum* ($p > 0,05$). A mediodía esta tendencia se mantuvo. En ningún caso los valores de F_v/F_m fueron inferiores a 0,75.

La estimación del rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{II} , Figura 6.6), no mostró diferencias significativas en la influencia del hongo ($F=1,62$; $p > 0,2$). Se apreció una pequeña influencia del tipo de sustrato, pero el efecto fue marginalmente significativo ($F=3,98$; $p=0,056$). Así, las plantas cultivadas en turba/perlita tenían valores más altos que las cultivadas en turba/piedra.

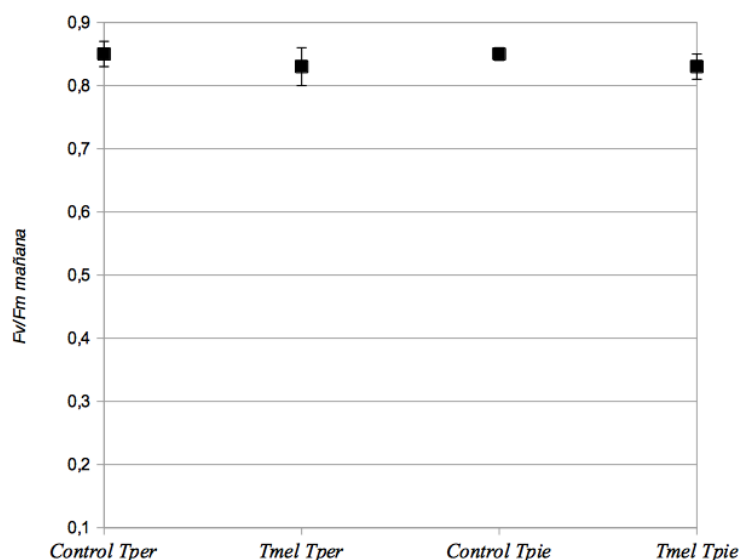


Figura 6.4. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al amanecer (relación F_v/F_m). El cuadrado negro representa la media de los datos y los corchetes indican la desviación típica. Los valores seguidos de asterisco son significativamente diferentes para el Test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Tper= Turba/perlita; Tpie= Turba/piedra. Tmel= plantas micorrizadas.

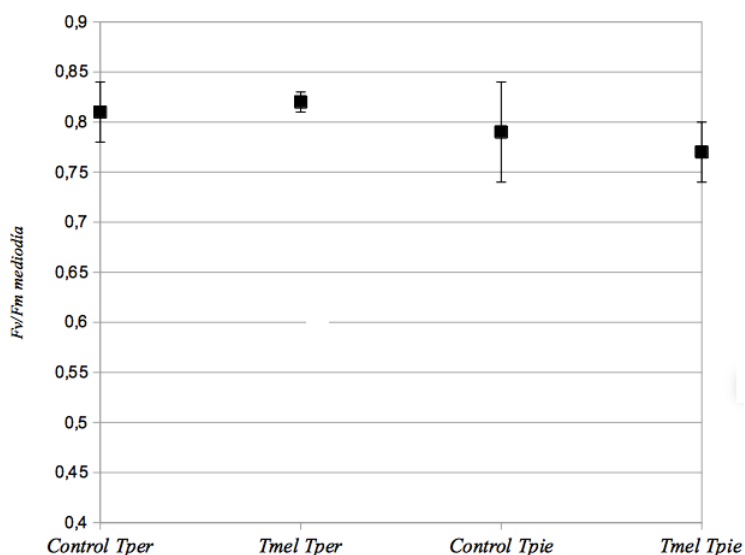


Figura 6.5. Efecto de la micorrización sobre la fluorescencia al mediodía (relación F_v/F_m). El cuadrado negro representa la media de los datos y los corchetes indican la desviación típica. Los valores seguidos de asterisco son significativamente diferentes para el Test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Tper= Turba/perlita; Tpie= Turba/piedra. Tmel= plantas micorrizadas.

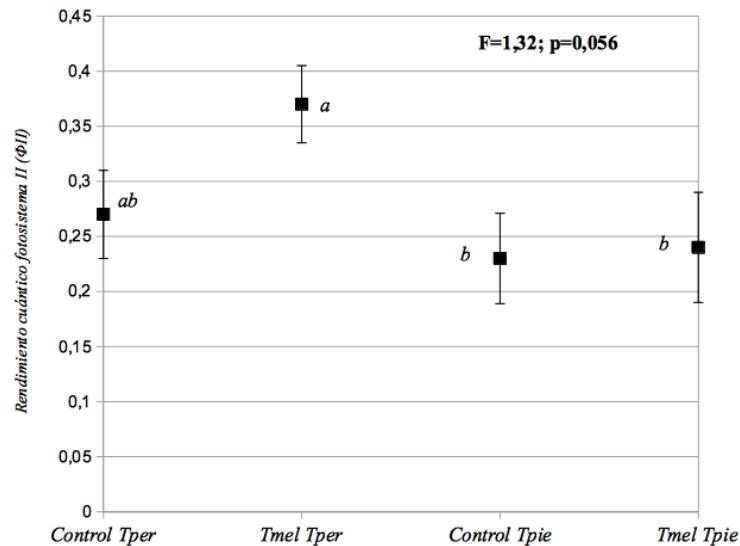


Figura 6.6. Valores medidos de Φ_{II} por tratamiento. El cuadrado negro representa la media de los datos y los corchetes indican la desviación típica. Los valores seguidos de distinta letra son significativamente diferentes para el Test de Tukey ($p < 0,05$). Tper= Turba/perlita; Tpie= Turba/piedra. Tmel= plantas micorrizadas.

El potencial hídrico de madrugada en las plantas cultivadas en turba/perlita fue en promedio más alto (menos negativo) que los individuos que crecieron en turba/piedra ($F=5,04$; $p < 0,04$) (Figura 6.7). Las plantas no micorrizadas con *T. melanosporum* tuvieron una influencia distinta sobre el potencial hídrico según el sustrato de cultivo (interacción Micorrización $\times$ Sustrato $F=6,29$; $p < 0,02$). Esta interacción viene marcada por las plantas control en turba/piedra, que mostraron valores significativamente más negativos de potencial hídrico que el resto de tratamientos. Las plantas micorrizadas con *T. melanosporum* presentaron valores idénticos, tanto de madrugada como al mediodía, independientemente del sustrato en el que habían sido cultivadas.

A mediodía (figura 6.8), el efecto del tipo de sustrato sobre el potencial hídrico se mantuvo, con las plantas cultivadas en turba/perlita con mayor potencial hídrico que las cultivadas en turba/piedra ($p < 0,05$). Las plantas control producidas en turba/piedra mantuvieron potenciales hídricos más negativos que el resto de tratamientos, y fueron significativamente diferentes a los de las plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum*.

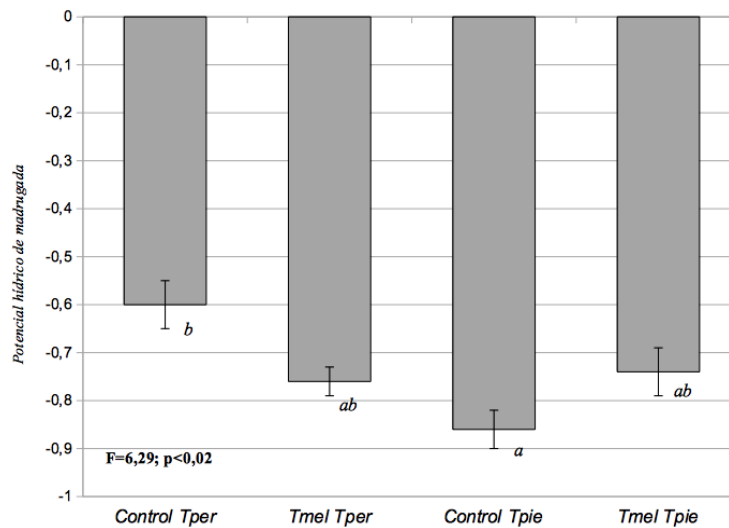


Figura 6.7. Potencial hídrico de madrugada por tratamiento de *Castanea sativa*. Las barras indican la media de los valores, y los corchetes la desviación típica de los mismos. Los datos seguidos con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Tukey ($p < 0,05$). Tper= Turba/perlita; Tpie= Turba/piedra. Tmel= plantas micorrizadas.

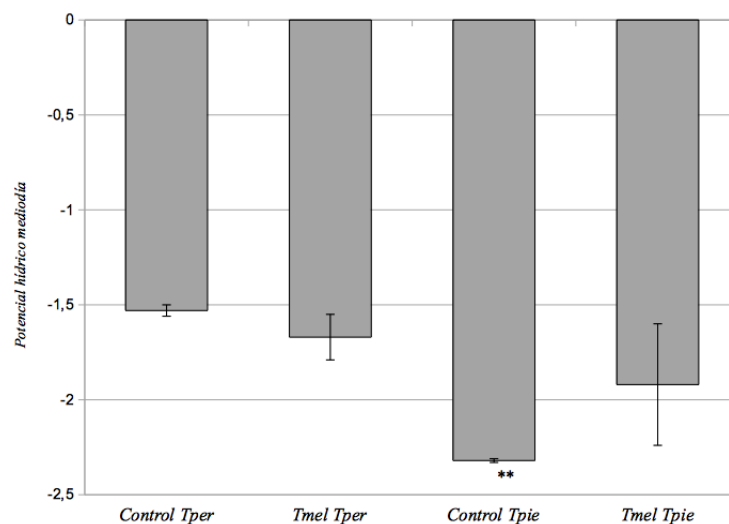


Figura 6.8. Mediciones de potencial hídrico de mediodía por tratamiento de *Castanea sativa*. Las barras indican la media de los valores, y los corchetes la desviación típica de los mismos. Los datos marcados con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas en el test de Kruskal-Wallis ($p < 0,005$). Tper= Turba/perlita; Tpie= Turba/piedra. Tmel= plantas micorrizadas.

La concentración de todos los nutrientes minerales fue mayor en la parte aérea que en la radical (N: $6,5 \pm 0,9$ vs. $4,9 \pm 0,9$ mg/g, $F=3,78$; $p<0,005$; P: $0,8 \pm 0,2$ vs. $0,4 \pm 0,1$ mg/g, $F=6,20$, $p<0,001$; K: $2,3 \pm 0,7$ vs. $1,0 \pm 0,3$ mg/g, $F=5,29$, $p<0,001$; y Ca $7,9 \pm 2,3$ vs. Ca: $7,7 \pm 2,3$ mg/g; $p<0,05$). En cambio, la concentración de Fe fue similar en parte aérea y radical (datos no mostrados). Las plantas micorrizadas acumularon significativamente menor cantidad de N ($F=13,90$; $p<0,002$) y de Fe ($F=19,32$; $p<0,001$) que las plantas control (Tabla 6.3). El sustrato influyó en la concentración de P ($F=8,97$; $p<0,006$) y de Ca ($p<0,025$), y en ambos casos fue más elevada en el sustrato turba/piedra que en el sustrato turba/perlita. La concentración de K no se vio influenciada ni por el sustrato ni por la micorrización por *T. melanosporum*. Se encontró una interacción entre el sustrato utilizado y la presencia de *T. melanosporum* en la concentración de Fe ($F=6,32$; $p<0,02$), viéndose menor concentración en las raíces micorrizadas de las plantas turba/piedra, y de Ca ($F=4,32$; $p<0,01$), donde las plantas micorrizadas cultivadas en turba/piedra tuvieron mayor concentración.

Tabla 6.3. Concentración de N, P, K, Fe y Ca (mg/g) por tratamiento. Los valores seguidos de distinta letra indican diferencias estadísticamente significativas para el test de Tukey ($p<0,05$)

Variable	Sustrato Turba/perlita				Sustrato Turba/piedra			
	Control		<i>T. melanosporum</i>		Control		<i>T. melanosporum</i>	
N (mg/g)	$7,6 \pm 1,3$	ab	$5,8 \pm 0,7$	ab	$7,8 \pm 1,2$	a	$5,6 \pm 0,6$	b
P (mg/g)	$0,6 \pm 0,17$	b	$0,6 \pm 0,2$	b	$1,0 \pm 0,5$	a	$0,7 \pm 0,1$	ab
K (mg/g)	$1,8 \pm 0,8$	a	$1,7 \pm 0,7$	a	$2,3 \pm 0,5$	a	$1,7 \pm 0,5$	a
Fe (mg/g)	$0,1 \pm 0,04$	a	$0,08 \pm 0,05$	ab	$0,1 \pm 0,3$	a	$0,02 \pm 0,01$	b
Ca (mg/g)	$7,3 \pm 0,6$	a	$6,6 \pm 0,9$	a	$7,5 \pm 0,8$	a	$9,8 \pm 0,3$	b

6.4. Discusión

Castanea sativa es una especie arbórea caracterizada por su gran vigor, la calidad de la producción de su madera, y el valor de su producción frutal. Requiere suelos profundos que favorecen la extensión de su sistema radical, generalmente con pH cercano a la neutralidad, sin presencia de arcillas, permeables, y con cantidad elevada de materia orgánica (Berrocal et al. 1998). Está considerado como una especie que tras la últimas glaciaciones podría haberse diseminado desde refugios situados en el Sur de Europa, entre ellos España (Conedera et al., 2004; Krebs et al. 2004). Como anfitrión natural de *T. melanosporum*, sería interesante su cultivo ya que permitiría compatibilizar el aprovechamiento micológico, maderero y frutal en un mismo terreno (Benucci et al. 2012). En este ensayo se definió la simbiosis de *Castanea sativa*

y de *T. melanosporum* de forma exitosa (Boutekrabt et al.1990; Mamoun y Olivier 1990; Nardini et al. 2000; Domínguez-Núñez 2002; Domínguez-Núñez et al. 2006, 2008, 2009).

La micorrización con *T. melanosporum* no influyó de manera destacable en el crecimiento de las plantas, aunque en condiciones de exceso de calcio en suelo, tal como se observa en el tratamiento turba/piedra, el aumento de biomasa se vio favorecido extraordinariamente. Se han dado resultados variables sobre la influencia de *T. melanosporum* en el crecimiento de su anfitrión, pero por ejemplo *Q. petraea* (Matt.) Liebl. creció más en plantas micorrizadas por esta especie (Domínguez-Núñez et al. 2008). El efecto positivo de la micorrización está claramente reflejado en las plantas cultivadas en el sustrato turba/piedra, quedando los resultados obtenidos en este trabajo con los de García-Montero et al. (2012). *T. melanosporum* utilizaría compuestos de Ca presentes en el suelo para producir deficiencias nutricionales en la planta, lo que provocaría como respuesta un aumento en desarrollo del sistema radical y en la formación de raíces finas. Este aumento del sistema radical permitiría el hongo micorrizarse a la planta, y compensaría mediante esta simbiosis las deficiencias nutricionales del anfitrión. A pesar de que no se encontraron diferencias en el porcentaje final de micorrización en función del sustrato utilizado, presumiblemente se puede asumir que las plantas crecidas en turba/piedra pudieron formar más cantidad de micorrizas, dado que desarrollaron un sistema radical mayor.

La sensibilidad se manifestó más claramente en la estimación del rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{II}), que mostró niveles significativamente menores en las plantas cultivadas en turba/piedra. Esto podría interpretarse como una caída de la carboxilación debida a problemas de ineficiencia del sistema fotosintético por deficiencias nutricionales, que serían producidas por menor concentración de Fe en las hojas de las plantas producidas en turba/piedra, o bien podría reflejar el efecto producido por la detección de sensibilidad a alguna sal o ión (Maxwell y Johnson 2000; Misra et al. 2001). No obstante, estas deficiencias no se muestran determinantes con los valores medidos de F_v/F_m , que son bastante correctos y superiores a 0,75, límite en el que se empieza a considerar que hay presencia de estrés en la plantas (van Kooten y Snel 1990; Trissl et al. 1993). Además, los castaños presentaron buenos niveles de NPK en sus tejidos, independientemente del sustrato de cultivo, excepto en la asimilación y concentración de P, que fue mayor en las plantas cultivadas en turba/piedra. En general, la micorrización disminuyó la concentración de estos nutrientes en los tejidos de las plantas, lo que podía haber influido negativamente en los procesos fotosintéticos.

Por otra parte, la caída de la estimación del rendimiento cuántico (Φ_{II}) puede ser una señal de que la planta está comenzando a sufrir estrés hídrico, teniendo como resultado el cierre estomático. Esto limitaría la absorción de CO₂ y por tanto, se produciría una disminución de su concentración interna (Maxwell y Johnson 2000). El Ca se ha relacionado con el cierre estomático, debido a procesos de transporte pasivo del ión por el flujo transpirado que lo

llevaría hacia las hojas, donde se considera que queda inmovilizado, lo que facilitaría el cierre estomático (Atkinson et al. 1990; Roberntz y Stockfors 1998).

Los trabajos de Nardini et al. (2000) con encinas micorrizadas con *T. melanosporum* muestran que las plantas tienen un flujo vertical de agua en el tallo y hojas más eficiente y una mayor fijación de CO₂ que las plantas no micorrizadas, que serviría para compensar caídas de conductancia hidráulica en raíces con la formación de mayor número de las mismas, aunque en otros trabajos no se ha encontrado ningún efecto de la micorriza de *T. melanosporum* en el estado hídrico de la planta (Domínguez-Núñez et al. 2009). En este ensayo, se encontraron diferencias en el estado hídrico de las plantas de madrugada y a mediodía. El cultivo en el sustrato turba/piedra hizo que las plantas presentaran potenciales hídricos más bajos, y este efecto fue más negativo para las plantas micorrizadas, que se comportaron de una forma parecida independientemente del sustrato de cultivo, no existiendo una relación clara con la biomasa aérea de la planta y por una mayor transpiración relacionada con el tamaño de la planta. Por tanto, se podría achacar este efecto a la presencia del hongo, que permitiría una mayor captación de agua en el sustrato turba/piedra, como se ha descrito clásicamente (Coleman et al. 1990; Domínguez Núñez 2002).

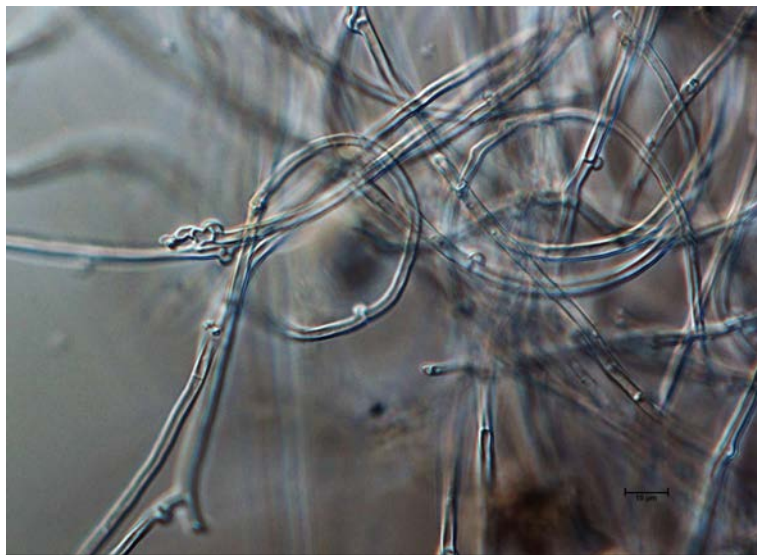
En definitiva, la micorrización de *Castanea sativa* con *Tuber melanosporum* es posible, y además favorece de manera importante el crecimiento de la planta en presencia de calcio en el sustrato. En ausencia de calcio en el sustrato, la plantas no se encuentra afectadas ni morfológicamente, ni nutricionalmente, ni fisiológicamente por la micorrización. La adicción de piedra caliza al sustrato posiblemente aumentó la cantidad de microondas, aunque este dato no se ha analizado. No obstante, sería conveniente la realización de nuevos trabajos que evalúen los efectos del calcio en la fisiología de los anfitriones de *T. melanosporum*, con el fin de explicar adecuadamente los mecanismos explicados y su aplicación posterior en el manejo de plantaciones productoras de trufa.



Conclusiones

1. Los datos de fructificaciones de hongos en *Castanea sativa* Mill. en la presente memoria indican una elevada biodiversidad de macromicetes en el Bierzo mayor que la citada en trabajos previos, en masas forestales de esta especie.
2. Ampliando el estudio de las comunidades estomicorrícicas a un estudio de la simbiosis a nivel de raíz, la biodiversidad fúngica aumenta considerablemente y además no se correlaciona con lo observado en los muestreos de fructificaciones.
3. Debido a que el objetivo de este trabajo fue la obtención de material para ser utilizado como fuente de inóculo y no estudiar la biodiversidad de los hongos de los castaños somos conscientes que la riqueza fúngica ha sido infravalorada.
4. Considerando la potencialidad de productividad de hongos ectomicorrícicos comestibles vemos necesario el planteamiento de estudios que amplíen el conocimiento en las variaciones de abundancia y riqueza de fructificación de carpóforos en relación a variables climáticas, vegetación y prácticas silvícolas de los castaños. Se podrían así desarrollar programas de gestión y conservación de la diversidad fúngica como recurso forestal, dinamizador de la economía y desarrollo rural de la zona.
5. A pesar de la utilización de sustratos de cultivo ricos en carbonato cálcico requeridos para el crecimiento de *Tuber* spp, la micorrización en vivero con *Castanea sativa* Mill., considerada especie calcífuga, ha sido viable.
6. En este trabajo se ha micorrizado *Castanea sativa* producida a partir de semilla y clones de *C. sativa* x *C. crenata* con *T. aestivum*, *Tuber borchii*, *T. brumale*, *T. macrosporum*, *T. melanosporum* y *T. uncinatum*. Excepto *T. borchii*, el resto han constituido la descripción de nuevas síntesis micorrícicas en vivero con castaño.
7. Se obtuvo buen grado de micorrización para *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. uncinatum* y *T. melanosporum*. *T. macrosporum* colonizó de forma heterógena las plantas por lo que no podemos asegurar la calidad de micorrización de *C. sativa* con esta especie de trufa. *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. uncinatum* tienen un efecto beneficioso en el crecimiento de las plantas de *C. sativa* y mejora sus condiciones hídricas.
8. En el caso concreto de *T. macrosporum* no podemos indicar ningún efecto sobre el crecimiento y fisiología de *C. sativa* por la variable micorrización.

9. La micorrización con *T. melanosporum* fue también viable y exitosa pero hubo diferentes efectos sobre *C. sativa* en función del sustrato de cultivo. En ausencia de caliza en el sustrato, la micorrización no tuvo efecto sobre la morfología ni el estado nutricional y fisiológico. La adición de piedra caliza al sustrato favorece de manera importante el crecimiento del sistema radical, lo cual puede a su vez favorecer la micorrización.
10. En este trabajo se ha micorrizado por primera vez clones de *Castanea sativa* x *Castanea crenata* con las especies de *Tuber borchii*, *T. macrosporum*, *T. aestivum* y *T. melanosporum*. La micorrización con las cuatro especies es factible si bien el resultado depende de las características intrínsecas del clon. La micorrización con *T. borchii* y *T. aestivum* ha alcanzado niveles satisfactorios, mientras que con *T. macrosporum* o *T. melanosporum* son bajos. La nutrición de los clones se ve favorecida con la simbiosis, aunque el crecimiento se ve mermado posiblemente por el efecto sumidero que provoca la demanda de fotosintatos por parte del hongo. La fisiología de los clones no se ve afectada negativamente por la micorrización.
11. Es necesario un mayor estudio de la condición calcífuga de *C. sativa* ya que si puede soportar el carbonato cálcico en campo se podrían instalar plantaciones potencialmente productoras de trufas. Esto podría generar un sistema agroforestal con triple aprovechamiento; frutícola, maderero y trufero.
12. Se hacen necesarios nuevos estudios que analicen la viabilidad de la relación simbiótica en campo, así como los efectos de las diferentes especies de *Tuber* en la nutrición y fisiología de las plantas, especialmente aquellos relacionados con el metabolismo del calcio y del potasio en los hospedantes.
13. Los resultados de micorrización de *T. macrosporum* son similares a los obtenidos por otros autores por lo que son necesarios más estudios para optimizar la producción de planta de calidad micorrizada en vivero.
14. En vista de los resultados de micorrización con clones es necesario ampliar la selección para elegir los más idóneos y trabajar también con clones puros de *C. sativa*. Es necesario confirmar la capacidad de tolerancia de *C. crenata* al carbonato cálcico.
15. Confirmado el elevado grado de colonización del sistema radical de *C. sativa* por *Tuber* spp. sería interesante evaluar el efecto que pudieran tener estos hongos ectomicorrícicos como control biológico de *Phytophthora* spp.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abreu CA, Coutinho JF, Cardoso AO, Campos JA. 1993. Suppressive soils and ink disease. Proceedings of the International Congress on Chestnut, Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano, Ed. Spoleto (Italy), pp 533-536.
- Águeda B, Parladé J, de Miguel AM, Martínez-Peña F. 2006. Characterization and identification of field ectomycorrhizas of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*. *Mycologia* 98:23–30.
- Agerer R. ed. 1987–2012. Colour Atlas of Ectomycorrhizae, 1st – 15th del., Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Allué JL. 1990. Atlas fitoclimático de España. Monografías INIA, nº 69. MAPA-INIA, Madrid.
- Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G, Potenza L, Stocchi, V. 1998. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Molecular Ecology* 7: 273–277
- Arnolds, EE. 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 35(2): 209-244.
- Arnolds. E 2010. The fate of hydroid fungi in the Netherlands and Northwestern Europe. *Fungal Ecology* 3: 81–88
- Atkinson CJ, Mansfield TA, Davies WJ. 1990. Does calcium in xylem sap regulate stomatal conductance?. *New Phytologist* 116: 19-27.
- Augé RM, Schekel KA, Wample RL. 1986. Osmotic adjustment on leaves of VA mycorrhizal and non-mycorrhizal rose plants in response to drought stress. *Plant Physiology* 82: 765-770.
- Azul AM, Sousa JP, Agerer R, Martín MP, Freitas H. 2010. Land use practices and ectomycorrhizal fungal communities from oak woodlands dominated by *Quercus suber* L. considering drought scenarios. *Mycorrhiza* 20(2): 73-88.
- Baptista P, Martins A, Tavares R M, Lino-Neto, T. 2010. Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecology* 3(1): 9-19.
- Baptista P, Reis F, Pereira E, Tavares RM, Santos P, Richard F, ... y Lino-Neto T. (2015). Soil DNA pyrosequencing and fruitbody surveys reveal contrasting diversity for various fungal ecological guilds in chestnut orchards. *Environmental microbiology reports*.
- Basso MT. 1999. *Lactarius*. Fungi Europaei 7. Mycoflora. Alassio.

- Bencivega M, Venanzi G. 1990. Alcune osservazioni sull'accrescimento delle piante tartufigene in pieno campo. In: Bencivega M. Granetti B. (Eds.), Atti del II Congresso Internazionale sull'Tartufo. Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano. Spoleto: 241-248.
- Bending GD, Read DJ. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* 130: 401-409.
- Benucci GMN, Raggi L, Di Massimo G, Baciarelli-Falini L, Bencivenga M, Falcinelli M, Albertini E. 2011. Species-specific primers for the identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber macrosporum* Vittad. *Molecular Ecology Resources* 11 378–381.
- Benucci G, Bonito G, Falini L, Bencivega M, Donnini D. 2012a. Truffles, timber, food, and fuel: Sustainable approaches for multi-cropping truffles and economically important plants. In: Edible ectomycorrhizal mushrooms: Current knowledge and future prospects. Zambonelli A., Bonito G. (Eds). Springer.
- Benucci GM, Gógán Csorbai A, Baciarelli Falini L, Bencivega M, Di Massimo G, Donnini D, 2012b. Mycorrhization of *Quercus robur* L, *Quercus cerris* L, and *Corylus avellana* L. seedlings with *Tuber macrosporum* Vittad. *Mycorrhiza* 22: 639-646.
- Benucci GMN, Bonito G, Falini LB, Bencivenga M. 2012c. Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* 22(5): 383-392.
- Bernicchia A. 2005. *Polyporaceae* s.l. Fungi Europaei 10. Edizioni Candusso. Alassio.
- Berrocal M, Gallardo JF, Cardeñoso JM. 1998. El castaño. Ed Mundiprensa, Madrid.
- Blanco E, Casado MA, Costa M. 1997. Los bosques ibéricos: Una interpretación geobotánica. GeoPlaneta Ed. S. A.
- Blanco A, Rubio A, Sánchez O, Elena R, Gómez V. 2000. Autoecología de los castaños de Galicia (España). *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 9(2): 337-362.
- Blom JM, Vannini A, Vettraino AM, Hale MD, Godbold DL. 2009. Ectomycorrhizal community in a healthy and a *Phytophthora*-infected chesnut (*Castanea sativa* Mill.) stand in central Italy. *Mycorrhiza* 20: 25-38
- Boa ER. 2004. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people (Vol. 17). Food & Agriculture Org.
- Bon M. 2005. Guía de campo de los hongos de España y de Europa: una guía ilustrada [con] más de 1.500 especies y variedades. Omega.

- Bonet JA, Fischer CR, Colinas C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agronomy for Sustainable Development* 26: 69-76.
- Bourgeois C, Sevrin E, Lemaire J. 2004. Le châtaignier: un arbre, un bois. 2nd revised edition. Institut pour le Développement Forestier, Paris.
- Boutekrabt A, Chevalier G, Pargney JC, Dexheimer J. 1990. Mycorrhization par *Tuber melanosporum* Witt. de vitroplants de *Quercus robur* L. et *Quercus pubescens* Willd.. *Agronomie* 2: 127-132.
- Branzanti MB, Rocca E, Zambonelli A. 1994. Influenza di funghi ectomicorrizici su *Phytophthora cambivora* e *P. cinnamomi* del castagno. *Mycologia Italiana* 1: 47-52.
- Branzanti MB, Rocca E, Pisi A. 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9: 103-109.
- Brundrett MC. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
- Buée M, Vairelles D, Garbaye J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15(4): 235-245.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184: 449-456.
- Büntgen U, Egli S, Camarero J, Fischer EM, Stobbe U, Kauserud H, Tegel W, Sproll L, Stenseth NC. 2012. Drought-induced decline in Mediterranean truffle harvest. *Nature Climate Change* 2: 827-829.
- Candusso M, Lanzoni G. 1990. *Lepiota* s.l. Fungi Europaei 4. Libreria Editrice Giovanna Biella. Saronno.
- Carvalho FA, Ferreira IC, Barreira JC, Barros L, Martins A. 2013. Evaluation of the chemical interactions in co-culture elements of *Castanea sativa* Miller mycorrhization. *Industrial Crops and Products* 42: 105-112.
- Castro J, Zamora R, Hódar JA, Gómez JM. 2004. Seedling establishment of a boreal tree species (*Pinus sylvestris*) at its southernmost distribution limit: consequences of being in a marginal Mediterranean habitat. *Journal of Ecology* 92(2): 266-277.
- Castroviejo, S. (coord. gen.). 1986-2012. Flora Iberica -8, 10-15, 17-18, 21. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C. 2003. Le specie europee del genere *Tuber*: Una revisione storica. Regione Piemonte, Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino.
- Ceulemans R, Saugier B. 1991. Photosynthesis. In: Physiology of Tree (Raghavendra AS, Ed.). J. Wiley.
- Chauvin JE, Salesses G. 1988. Advances in chesnut micropropagation (*Castanea* sp.). *Acta Horticulturae* 227: 340-345.
- Chevalier G. 1973. Synthèse axénique des mycorrhizes de *Tuber brumale* Vitt. À partir de cultures pures du champignon. *Annales de phytopathologie* 68: 231-240.
- Chevalier G, Moussain D, Couteudier Y. 1975. Associations ectomycorrhiziennes entre Tuberacées and Cistacées. *Annales de phytopathologie* 7: 335-356.
- Chevalier G, Grente J. 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt) *Mushroom Science* 10: 483-505.
- Chevalier G, Frochot H. 1990. Ecology and possibility of culture in Europe of the Burgundy truffle (*Tuber uncinatum* Chatin). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 28: 71-73.
- Chira F, Chira D. 2003. Contribution to the knowledge of mycorrhizal fungi of chestnut forests of Baia Maré Forest District. *Revista de Silvicultura si Cinegetica* 17-18: 83-84.
- Coleman MD, Bledsoe CS, Smit BA. 1990. Root hydraulic conductivity and xylem sap levels of zeatin riboside and abscic acid in ectomycorrhizal fungi imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* 67: 29-39.
- Comandini O, Pacioni G, Rinaldi AC. 2001. An assessment of below-ground ectomycorrhizal diversity of *Abies alba* Miller in central Italy. *Plant Biosystems* 135: 337-350.
- Conedera M, Krebs P, Tinner W, Pradella M, Torrioni D. 2004. The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe: from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* 13 (3): 161-179.
- Conedera M, Krebs P. 2008. History, Present Situation and Perspective of Chestnut Cultivation in Europe. In: Abreu CG, Peixoto FP, Gomes-Laranjo J. (eds): Proceedings of the second Iberian Chestnut Congress, Vila Real (P), June 20-22th 2007. *Acta Horticulturae* 784: 23-27.
- Conn C, Dighton J. 2000. Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 489-496.

- Cortina J, Maestre FT, Vallejo R, Baeza MJ, Valdecantos A, Pérez-Devesa M. 2006. Ecosystem structure, function, and restoration success: Are they related? *Journal for Nature Conservation* 14 (1-3): 152-160.
- Courtecuisse R, Duhem B. 1995. Mushrooms & toadstools of Britain and Europe. London: HarperCollins.
- Courty PE, Franc A, Pierrat JC, Garbaye J. 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* 74(18): 5792-5801.
- Courty PE, Buée M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, ... & Garbaye J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* 42(5): 679-698.
- Cuenca B, Majada JP. 2012. *Castanea sativa* Mill. In: Producción y manejo de semillas y plantas forestales. DG de la Biodiversidad. MAGRAMA. Madrid.
- Dahlberg A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150(3): 555-562.
- 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.
- De Román M, Boa E. 2004. Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. *Micología Aplicada Internacional* 16(2): 25-33
- De Román M, Claveria V, De Miguel AM. 2005. A revision of the descriptions of ectomycorrhizae published since 1961. *Mycological research* 109(10): 1063-1104.
- De Román M, De Miguel AM. 2005. Post-fire, seasonal and annual dynamics of ectomycorrhizal community of *Quercus ilex* L. forest over a 3-year period. *Mycorrhiza* 15: 471-382.
- Deschamps JR. 2002. Hongos silvestres comestibles del Mercosur con valor gastronómico. Documento de Trabajo N 86, Universidad de Belgrano.
- DGCN (Dirección General de Conservación de la Naturaleza) (1997-2006). Mapa Forestal de España 1:50.000 (MFE50). Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- DGCN (Dirección General de Conservación de la Naturaleza) 2007. Tercer Inventario Forestal Nacional (IFN3). Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Di Pietro M, Churin JL, Garbaye J. 2007. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza* 17: 547-550.

- Diamandis S, Perlerou C. 2001. The mycoflora of the chestnut ecosystems in Greece. *Forest Snow and Landscape Research* 76: 499–504.
- Díaz G, Carrillo C, Honrubia M. 2010. Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science* 67: 1-9.
- Díaz Varela RA, Calvo Iglesias MS, Díaz Varela ER, Ramil Rego P, Crecente Maseda R. 2009. *Castanea sativa* forests: a threatened cultural landscape in Galicia NW Spain. In: Krzywinski K, O’Connell M, Küster H (eds). *Cultural landscapes of Europe. Fields of demeter haunts of pan*. Aschembeck Media UG, Bremen, pp 94–95.
- Domínguez-Núñez JA. 2002. Aportaciones a la micorrización artificial con trufa negra en planta forestal. Tesis Doctoral UPM. Madrid.
- Domínguez-Núñez JA, Serrano JS, Rodríguez Barreal JA, Saiz de Omeñaca JA. 2006. The influence of micorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. *Forest Ecology and Management* 231: 226-233.
- Domínguez-Núñez JA, Planelles R, Rodríguez Barreal JA, Saiz de Omeñaca JA. 2008. The effect of *Tuber melanosporum* Vitt. Mycorrhization on growth, nutrition, and water relations of *Quercus petraea* Liebl., *Quercus faginea* Lamk., and *Pinus halepensis* Mill. seedlings. *New Forest* 35: 159-171.
- Domínguez-Núñez JA, Planelles R, Rodríguez Barreal JA, Saiz de Omeñaca JA. 2009. Influence of water-stress acclimation and *Tuber melanosporum* on *Quercus ilex* seedlings. *Agroforestry Systems* 75: 251-259.
- Donnini D, Benucci GMN, Bencivenga M, Baciarelli-Falini L. 2014. Quality assessment of truffle-inoculated seedlings in Italy: proposing revised parameters for certification. *Forest Systems* 23(2): 385-393.
- Douet JP, Castroviejo M, Mabru D, Chevalier G, Dupré C, Bergougnoux F, Ricard JM, Médina B. 2004 Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379: 668-673.
- Duan X, Neumann DS, Reiber JM, Green CD, Saxton AM, Augé RM. 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47: 1541-1550.
- Egger KN, Hibbett DS. 2004. The evolutionary implications of exploitation in mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 82: 1110–1121

- Epron D, Dreyer E, Bréda N. 1992. Photosynthesis of oak trees (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) during drought stress under field conditions: diurnal course of net CO₂ assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant, Cell and Environment* 15: 809-820.
- FAO. 2006. Guidelines for soil description, 4th edition, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fabbio G, Merlo M, Tosi V. 2003. Silvicultural management in maintaining biodiversity and resistance of forest in Europe- the Mediterranean region. *Journal of Environmental Management* 67 (1): 67-76.
- Ferry BW, Das N. 1968. Carbon nutrition of some mycorrhizal *Boletus* species. *Transactions of the British Mycological Society* 51(5): 795-798.
- Fernández López J, Vázquez-Ruiz-de-Ocenda RA, Díaz-Vázquez R, Pereira-Lorenzo S. 2001. Evaluation of resistance of *Castanea* sp. Clones to *Phytophthora* sp. Using excised chesnut shoots. *Forest Snow Landscaper Research* 76 451-454.
- Fernández López J, Miranda-Fontañá ME, Furones Pérez P. 2008. Caracteres de selección en campo de clones de castaño híbrido (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) para la producción de madera. *Cuadernos Sociedad Española de Ciencias Forestales* 24: 39-43.
- Fernández-Manso AA, Robles Llamazares JA. 2009. El castaño en la comarca de El Bierzo: análisis y diagnóstico de su problemática. *Actas 5º Congreso Forestal Español*, Ávila.
- Ferris R, Peace AJ, Newton AC. 2000. Macrofungal communities of lowland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten.) plantations in England: relationships with site factors and stand structure. *Forest Ecology and Management* 131: 255-267.
- Finlay R. 2005. Action and Interaction in the Mycorrhizal Hyphosphere—a Re-evaluation of the Role of Mycorrhizas in Nutrient Acquisition and Plant Ecology. In *Nutrient Acquisition by Plants* (pp. 221-276). Springer Berlin Heidelberg.
- Finlay R. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59(5): 1115-1126.
- Fischer C, Suz LM, Martín MP, Colinas C. 2004. *Tuber brumale* Vitt.+ *Quercus ilex* L. *Descriptions of Ectomycorrhizae* 7(8): 135-141.
- Flórez J, Santín PJ, Sánchez JA, Del Pino FJ, Melcón P. 2001. El castaño: manual y guía didáctica. Ediciones IRMA S. L., León.
- Frank B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 3:128-145

- Gallastegui C. 1926. Técnica de la hibridación artificial del castaño. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. Tomo XXVI 88-94.
- Gamon JA, Pearcy RW. 1989. Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*. *Oecologia* 79: 475-481.
- Gandullo JM, Rubio A, Sánchez O, Blanco A, Elena R, Gómez V. 2004. Las estaciones ecológicas de los castaños españoles. Editorial: *Monografías INIA: Serie Forestal*. Nº 7. Ministerio de Educación y Ciencia.
- Garbaye J. 2000. The role of ectomycorrhizal symbiosis in the resistance of forest to water stress. *Outlook on Agriculture* 29(1): 63-69.
- García-Montero LG, Manjón JL, Pascual C, García-Abril A. 2007a. Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. *Forest Ecology and Management* 242: 288-296.
- García-Montero LG, Casermeiro MA, Hernando I, Hernando J. 2007b. Effect of active carbonate, exchangeable calcium and stoniness of soil on *Tuber melanosporum* carpophore production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 35(1): 139-146.
- García-Montero LG, Quintana A, Valverde-Asenjo I, Díaz P. 2009. Calcareous amendments in truffle culture: a soil nutrition hypothesis. *Soil Biology and Biochemistry* Vol 41: 1227-1232.
- García-Montero LG, Valverde-Asenjo I, Moreno D, Díaz P, Hernando I, Menta C, Tarasconi K. 2012. Influence of edaphic factors on edible ectomycorrhizal mushrooms: New hypotheses on soil nutrition and C sinks associated to ectomycorrhizae and soil fauna using the *Tuber brulé* model. In: Edible ectomycorrhizal mushrooms: Current knowledge and future prospects. Zambonelli A., Bonito G. (Eds). Springer.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69(1): 180-190.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2(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.

- Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79: 1562–1572.
- Giovannetti G, Fontana A. 1981. Simbiosi micorrizica di *Tuber macrosporum* Vitt. con alcune Fagales. *Allionia* 24: 13-17.
- Granetti B. 1985. Caratteristiche morfologiche, biometriche e strutturali delle micorrize di interesse economico. *Micologia Italiana* 2: 101-117.
- Goicoechea N, Dolezal K, Antolin MC, Strnad M, Sánchez-Díaz M. 1995. Influence of mycorrhizae and *Rhizobium* on cytokinin content in drought-stressed alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 46: 1543-1549.
- Goltapeh EM, Danesh YR, Prasad R, Varma A. 2008. Mycorrhizal fungi: what we know and what should we know? In Mycorrhiza, Varma A (Eds). SpringerLink
- Google Earth, Digital Globe 2015. Acceso 3 de noviembre de 2015. Imágenes de 2005.
- Griffiths RP, Caldwell BA. 1992. Mycorrhizal mat communities in forest soils. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ. (Eds.) Mycorrhizas in Ecosystems. CAB International: 98-105.
- Gryndler M, Hrselová H, Soukopová L, Streiblová E, Valda S, Borovicka J, Gryndlerová H, Gazo J, Miko M. 2011. Detection of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) in ectomycorrhizae and in soil using specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 318: 84-89.
- Guerin-Laguette A, Plassard C, Mousain D. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 790–799
- Hall IR, Stephenson SL, Buchanan PK, Wang Y, Cole ALJ. 2003a. Edible and poisonous mushrooms of the world. Timber, Portland, OR.
- Hall IR, Wang Y, Amicucci A. 2003b. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnology* 21:433–438.
- Hall IR, Brown G, Zambonelli A. 2007. Taming the truffle. The history, lore, and science of the ultimate mushroom. Timber, Portland, OR.
- Hall IR, Lyon A, Wang Y, Buchanan P. 2011. A list of putative edible or medicinal ectomycorrhizal mushrooms (revised). Dunedin, Truffles and Mushrooms (Consulting) Limited. <http://www.trufflesandmushrooms.co.nz/Hall%20et%20al.%20A%20putative%20List%20of%20EEMM%202011.pdf>

- Härkönen M, Tuomo N, Mwasumbi L. 2003. Tanzanian mushrooms. Edible, harmful and other fungi. Botanical Museum of Natural History, Helsinki.
- Harley JL, Harley EL. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* 105: 1–102
- Harley JL, Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 15 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105:1422–1432.
- Hilszczanska D, Malecka M, Sierota Z. 2008. Changes in nitrogen level and mycorrhizal structure of Scots pine seedlings inoculated with *Thelephora terrestris*. *Annals of Forest Science* 6: 409-415.
- Honrubia M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66(1): 133-144.
- Honrubia M, Torres P. 1989. Growth variation and cultural characteristics of *Suillus fluryi* Huijsm. in response to culture media and pH. *Agriculture Ecosystems and Environment* 28:191-196.
- Honrubia M. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66:1: 133-144. Real Jardín Botánico.
- Horton TR, Bruns TD. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 855–1871.
- Hung L, Trappe JM. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. *Mycologia* 75(2): 234-241.
- Hutchinson LJ. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon*, XLII: 387-504.
- Iotti M, Piattoni F, Zambonelli A. 2012. Techniques for host plant inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. In *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms* (pp. 145-161). Springer Berlin Heidelberg.
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD, 2005. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixedconifer forest. *New Phytologist* 166: 619-630.
- Jactel H, Menassieu P, Vetillard F, Gaullier A, Samalens JC, Brockerhoff EG. 2006. Tree species diversity reduces the invasibility of maritime stands by the bark scale, *Matsucoccus feytaudi* (Homoptera: Margarodidae). *Canadian Journal of Forest Research* 36(2): 314-323.

- Jacobs FD, Salifu KF, Seifert JR. 2005. Growth and nutritional response of hardwood seedlings to controlled release-fertilization at outplanting. *Forest Ecology and Management* 214: 28-39.
- Kårén O, Nylund JE. 1996. Effects of N-free fertilization on ectomycorrhiza community structure in Norway spruce stands in southern Sweden. *Plant and Soil* 181: 295–305.
- Kalra Y. (ed.). 1997. Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press.
- Karwa A, Varma A, Rai M. 2011. Edible ectomycorrhizal fungi: cultivation, conservation and challenges. In: Rai M, Varma A (eds), Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae, Soil biology 25. Springer, Berlin.
- Kennedy P, Nguyen N, Cohen H, Peay K. 2014. Missing checkerboards? An absence of competitive signal in *Alnus*-associated ectomycorrhizal fungal communities. *PeerJ*, 2, e686.
- Kohen AE, Rouhier H, Mousseau M. 1992. Changes in dry weight and nitrogen partitioning induced by elevated CO₂ depend on soil nutrient availability in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill). In *Annales des sciences forestières* Vol. 49 (2) pp. 83-90. EDP Sciences.
- Koide RT, Xu B, Sharda J. 2005. Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytologist* 166(1): 251-262.
- Koide RT, Shumway DL, Xu B, Sharda JN, 2007. On temporal partitioning of a community of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 174: 420-429.
- Konstantinidis P, Tsiourlis G, Xofis P, Buckley G. 2008. Taxonomy and ecology of *Castanea sativa* Mill. forests in Greece. *Plant Ecology* 195: 235-256.
- Kjøller R. 2006. Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiology Ecology* 58:214–224.
- Köljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, ... y Vrålstad T. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166(3): 1063-1068.
- Köljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AF, Bahram M, ... y Larsson KH. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22(21): 5271-5277.
- Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W. 2004. Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 145-160.

- Kuikka K, Härmä E, Markkola AM, Rautio P, Roitto M, Saikkonen K, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Tuomi J. 2003. Severe defoliation of Scots pine reduces reproductive investment by ectomycorrhizal symbionts. *Ecology* 84: 2051-2061.
- Ladurner H, Simonini G. 2003. *Xerocomus* s.l. *Fungi Europaei* 8. Edizioni Candusso. Alassio.
- Laganà A, Salerni E, Barluzzi C, Perini C, De Dominicis V. 2002. Macrofungi as long-term indicators of forest health and management in central Italy. *Cryptogomie Mycologie* 23: 39–50.
- Lario Leza FJ, Omil B, Merino A, Ocaña L. 2013. Caracterización de castaño híbrido en cultivos clonales de vivero. Efecto del tipo de multiplicación y la fertilización de recría en el cultivo clonal de castaño híbrido. *Actas del VI Congreso Forestal Español*. Ávila.
- Lauteri M, Monteverdi MC, Sansotta A, Cherubini M, Spaccino L, Villani F, Küçük M. 1998. Adaptation to drought in European chestnut. Evidences from a hybrid zone and from controlled crosses between drought and wet adapted populations. *Acta Horticulturae* 494: 345–353.
- Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossan C, Bréchet C, Robin C. 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labelling technique. *Plos One* 8(5): e64626.
- Le Tacon F, Rubini A, Murat C, Riccioni C, Robin C, Belfiori B, Zeller B, De la Varga H, Akroune E, Deveau A, Martin F, Paolocci F. 2014. Certainties and uncertainties about the life cycle of the Perigord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) *Annals of Forest Science*.
- Leonardi M, Paolocci F, Rubini A, Simonini G, Pacioni G. 2005. Assessment of inter-and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. *FEMS Microbiology Letters* 243(2): 411-416.
- Lilleskov EK, Bruns TD. 2001. Nitrogen and ectomycorrhizal fungal communities: what we know, what we need to know. *New Phytologist* 149: 156-158.
- Lindahl BD, de Boer W, Finlay RD. 2010. Disruption of root carbon transport into forest humus stimulates fungal opportunists at the expense of mycorrhizal fungi. *Isme Journal* 4: 872-881.
- Liu B. 1984. Medicinal fungi from China (Chinese). Taiyuan, Shaxi Peoples Publishing House.
- Lonsdale D, Pautasso M, Holdenrieder. 2008. Wood-decaying fungi in the forest: conservation needs management options. *European Journal of Forest Research* 127: 1-22.
- López M, Martínez-Peña F, Molina M, Hernández A, Lucas JA. 2005. Balance socioeconómico y funcional del primer año de aplicación de la experiencia piloto de regulación de la

- recolección de setas en montes de U.P. de la zona de pinares de Almazán (Soria). IV Congreso Forestal Español, Zaragoza.
- Mamoun M, Oliver JM. 1996. Receptivity of cloned hazels to artificial ectomycorrhizal infection by *Tuber melanosporum* and symbiotic competitors. *Mycorrhiza* 6: 15-19.
- Martín MA, Mattioni C, Cherubini M, Turchini D, Villani F. 2010. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 6: 735–744.
- Martín MA, Mattioni C, Molina JR, Alvarez JB, Cherubini M, Herrera MA, Villani F, Martín LM. 2012. Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genetics & Genomes* 8:127–136.
- Martins A. 2004. Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: aspectos fisiológicos da micorrização in vitro e ex vitro. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciencias da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Martins A, Barroso J, Pais MS. 1996. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* 6(4): 265-270.
- Martins A, Casimiro A, Pais MMS 1997. Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. *Mycorrhiza* 7: 161–165.
- Martins A, Marques G, Borges O, Portela E, Lousada J, Raimundo F, Madeira M. 2011. Management of chestnut plantations for a multifunctional land use under Mediterranean conditions: effects on productivity and sustainability. *Agroforestry Systems*, 81(2): 175-189.
- Martínez Peña F. 2008. Producción de carpóforos de macromicetes epigeos en masas ordenadas de *Pinus sylvestris* L. (Tesis Doctoral).
- Martínez-Peña F, Gómez Conejo R, Ortega-Martínez P. 2007. MICODATA - Sistema de información geográfica sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico en Castilla y León. <http://www.micodata.es>.
- Martínez-Peña F, Gómez Conejo R, Ortega-Martínez P. (2006–2010) MICODATA—Sistema de información geográfica sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico en Castilla y León. <http://www.micodata.es>. Accessed 30 December 2010.
- Martínez-Peña F, Rondet J. 2008. "Micosylva": Gestión selvícola de montes productores de hongos silvestres comestibles de interés socioeconómico como fuente de desarrollo rural.
- Martínez Peña F, Oria de Rueda J, Ágreda T. 2011. Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y León. [Castilla y León]: SOMACYL.

- Martínez-Peña F, Ágreda T, Águeda B, Ortega-Martínez P, Fernández-Toirán LM. 2012. Edible sporocarp production by age class in a Scots pine stand in Northern Spain. *Mycorrhiza* 22: 167–174.
- Marx DH. 1969a. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the fungi on the resistance to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Marx DH. 1969b. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the fungi on the resistance to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var *piceina*. *Phytopathology* 59: 411-417.
- Marx DH. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents. *Annual Review Phytopathology* 10: 429-454.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Menéndez-Miguélez M, Álvarez-Álvarez P, Majada J, Canga E. 2015. Effects of soil nutrients and environmental factors on site productivity in *Castanea sativa* Mill. coppice stands in NW Spain. *New Forests* 46: 217–233.
- Miller RM, Hetrick BAD, Wilson GWT. 1997. Mycorrhizal fungi affect root stele tissue in grasses. *Canadian Journal of Botany* 75: 1778-1784.
- Miranda-Fontaíña ME, Fernández-López J. 1992. The micropropagation of chestnut tree: in vivo establishment and post-propagation growth. In *Symposium Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species I* (pp. 421-426).
- Miranda-Fontaíña ME, Fernández López J. 1993. Micropropagación, cultivo en vivero y calidad de planta de clones híbridos de *Castanea sativa* y *Castanea crenata*. *Actas del Congreso Forestal Español*, Lourizán. Ponencias y comunicaciones, Tomo II: 343-348.
- Miranda-Fotaíña ME, Fernández-López J. 2005. Variabilidad cloral de castaño híbrido en resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, IV Congreso Forestal Español. Zaragoza. Mesa temática 2, Ponencia 4.
- Miranda-Fontaíña ME, Fernández López J, Furones Pérez P. 2007a. Influencia de la variedad de *Castanea sativa* Mill. y del portainjerto híbrido en la supervivencia y el vigor de las plantas de castaño. *Actas del II Congreso Ibérico do castanheiro*, pp: 223-226.
- Miranda-Fontaíña ME, Fernández López J, Vettraino AM, Vannini A. 2007b. Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora cinnamomi*: testing and genetic control. *Silvae Genetica* 56 (1): 11-20.

- Miranda-Fontaíña ME, Fernández López J. 2013. Caracterización de clones híbridos por su resistencia a la sequía y al encharcamiento en sustrato. Actas del VI Congreso Forestal Español. Ávila.
- Misra AN, Srivastava A, Strasser RJ. 2001. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and *Brassica* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 158: 1173-1181.
- Morcillo M, Sánchez M, Vilanova X. 2015. Cultivar trufas una realidad en expansión. Micología Forestal y Aplicada (Ed.) Barcelona.
- Müller WR, Rauscher T, Agerer R, Chevalier G. 1996. *Tuber uncinatum* Chat.+ *Corylus avellana* L. *Descriptions of Ectomycorrhizae* 1: 179-183.
- Muñoz JS. 2005. *Boletus* s.l. Fungi Europaei 2. Edizioni Candusso. Alassio
- Nara K. 2008. Community development patterns and ecological functions of ectomycorrhizal fungi: implications from primary succession. In: Varma A, editor. Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Berlin, Germany. Springer-Verlag
- Nara K, Nakaya H, Hogetsu T. 2003. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytologist* 158: 193–206.
- Nardini A, Salleo S, Tyree MT, Vertovec M. 2000. Influence of ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. *Annals of Forest Science* 57: 305-312.
- Napoli C, Mello A, Borra A, Vizzini A, Sourzat P, Bonfante P. 2010. *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist* 185: 237-247.
- Ndong HE, Degreef J, De Kesel A. 2011. Champignons comestibles des forêts denses d'Afrique centrale. Taxonomie et identification. ABC Taxa, vol 10. Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Brussels.
- Neville P, Poumarat S. 2004. *Amaniteae*. Fungi Europaei 9. Edizioni Candusso. Alassio.
- Ninyerola M, Pons X, Roure JM. 2005. Atlas Climático Digital de la Península Ibérica. Metodología y aplicaciones en bioclimatología y geobotánica. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.
- Noordelos ME. 1992. *Entoloma* s.l. Fungi Europaei 5. Librería Editrice Giovanna Biella. Saronno.

- Noordelos, ME. 2004. *Entoloma* s.l. Suplemento. Fungi Europaei 5a. Edizioni Candusso. Alassio.
- Oliet JA, Tejada M, Salifu KF, Collazos A, Jacobs DF. 2009. Performance and nutrient dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings in relation to nursery nutrient loading and post-transplant fertility. *European Journal of Forest Research* 128: 253-263.
- Olivier JM, Guinberteau J, Rondet J, Mamoun M. 1997. Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Revue Forestière Française* XLIX:222–234.
- O'Neill EG, Luxmoore RJ, Norby RJ. 1987. Increases in mycorrhizal colonisation and seedling growth in *Pinus echinata* and *Quercus alba* in an enriched CO₂ atmosphere. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 878-883.
- Oria de Rueda Salgueiro JA. 2007. Hongos y setas: Tesoro de nuestros montes. Cálamo, Palencia.
- Palenzona M, Chevalier G, Fontana A. 1972. Sintesi micorrizica tra i miceli in coltura di *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, *T. rufum* e semenzali di conifere e latifoglie. *Allionia* 18: 41-52.
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S. 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 23-30
- Parladé J. 2007. Use of mycorrhizal plants for controlled production of edible fungi. Current knowledge and future prospects. In: 1st world conference on the conservation and sustainable use of wild fungi, Córdoba, Junta de Andalucía, 10–16.
- Parladé J, Pera J, Luque J. 2003. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14:171-176.
- Patterson CL, Dimov LD. 2013. Effect of shade and fertilizer supplement on survival and growth of american chesnut seedlings. *Forestry Ideas* 19: 157–166.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD. 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58: 799–810.
- Peintner U, Iotti M, Klotz P, Bonuso E, Zambonelli A. 2007. Soil fungal communities in a *Castanea sativa* (chestnut) forest producing large quantities of *Boletus edulis* sensu lato (porcini): where is the mycelium of porcini?. *Environmental microbiology* 9(4) 880-889.
- Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M, Yescas-Pérez A, Delgado-Alvarado A, Xoconostle-Cázares B. 2008. Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62(3): 425–436.

- Pilz D, Molina R. 2002. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* 155(1–3): 3–16.
- Pilz D, Norvell L, Danell E, Molina R. 2003. Ecology and management of commercially harvested chanterelle mushrooms. General Technical Report PNW-GTR-576. USDA Forest Service, Portland, OR.
- Polemis E, Dimou D M, Pountzas, L. 2011. Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: 5. Basidiomycetes associated with woods dominated by *Castanea sativa* (Nafpactia Mts., central Greece). *Mycotaxon* 115: 535.
- Pomarico M, Figliuolo G, Rana GL. 2007. *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. *Biodiversity and Conservation* 16: 3447-3461.
- Prévosto B, Monnier Y, Christian R, Fernandez C. 2011. Diversification of *Pinus halepensis* forests by sowing *Quercus ilex* and *Quercus pubescens* acorns: testing the effects of different vegetation and soil treatments. *European Journal of Forest Research* 130: 67-76.
- Pruett GE. 2008. The biology and ecology of *Tuber aestivum* mycorrhizae establishment in the greenhouse and the field. Ph Tesis Dissertation. Missouri, USA.
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radojevic M, Bashkin, V. N. 1999. *Practical environmental analysis*. Royal Society of Chemistry.
- R.D. 289/2003 de 7 marzo sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. 2003. Boletín Oficial del Estado núm 58: 9262-9299.
- R. D. 895/2014 de 17 de octubre que aprueba el Reglamento técnico de Control y certificación de plantas de vivero de frutales. 2014. Boletín Oficial del Estado núm 266: 89559-89568.
- Reyna Domenech S, Pérez Badía R. 2000. Trufa, truficultura y selvicultura trufera. Ed Mundi-Prensa.
- Reyna S. 2007. Truficultura. Fundamento y Técnicas. Ed Mundi-Prensa.
- Ricard JM. 2003. La truffe. Guide technique de trufficulture. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes CTIFL, Paris
- Rincón A, Parladé J, Pera J. 2007. Influence of fertilization method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Annals of Forest Science* 64: 577-783.

- Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse MA. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166(3): 1011-1023.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1-45.
- Riva A. 1988, *Tricholoma*. Fungi Europaei 3. Edizioni Candusso. Alassio.
- Rivas-Martínez S. 1987. Memoria del mapa de vegetación de España. 1:400.000. ICONA, MAPA, Madrid.
- Rivas-Martínez S, Rivas S. Penas A. 2011a. Worldwide bioclimatic classification system. *Global Geobotany* 1(1): 1-638.
- Rivas-Martínez S. et al. 2011b. Mapa de series, geoserias y geopermaseries de vegetación de España: Memoria del mapa de vegetación potencial de España. Parte II. *Itinera Geobotanica* 18 (1-2): 1-800.
- Rivas-Martínez S, Penas Á, Díaz-González TE, del Río S, Canto P, Herrero L, Pinto C, Costa, JC. 2014 Biogeography of Spain and Portugal. Preliminary typological synopsis. *International Journal of Geobotanical Research* 4: 1-64.
- Roberntz P, Stockfors J. 1998. Effects of elevated CO₂ concentration and nutrition on net photosynthesis, stomatal conductance and needle respiration of field-grown Norway spruce trees. *Tree Physiology* 18: 233-241.
- Robich G. 2003. *Mycena* d' Europa. A.M.B. Centro Studi Micologici. Trento.
- Rocha Afonso ML. 1990. *Castanea crenata*, Flora Ibérica Volumen II: 12-15.
- Rodríguez L, Cuenca B, Pato B, Cámara MJ, Ocaña L. 2005. Producción in vitro y mediante estaquillado semiherbáceo de híbridos de castaño en un vivero comercial: coste y eficiencia de ambos sistemas. *Actas del IV Congreso Forestal, Zaragoza*.
- Ruiz de la Torre J. 2006. Flora mayor. D G. para la Biodiversidad. Ministerio Medio Ambiente Madrid.
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* 95(3): 472-478.
- Rubio A, Domínguez DG, Blanco A, Sanz VG, Sánchez O, Rosselló RE. 2000. Autoecología de los castaños de Galicia (España). Investigación agraria. *Sistemas y recursos forestales* 9(2): 337-362.
- Rubio A, Sánchez Palomares O, Gómez V, Graña D, Elena R, Blanco A. 2002. Autoecology of sweet-chestnut stands in Castile (Spain). *Forest Systems* 11(2): 373-393.

- Rubio E, Miranda MA, Linde J, Suárez A, García F, Juste P. 2006. Catálogo provisional de hongos hipogeos de Asturias y posibles fitobiontes asociados. *Revista Catalana de Micologia* 1-40.
- Rubio A, Gutiérrez R, García-Miranda González AG, Linares Barreal P. 2013. Diseño e implantación de un nuevo modelo productivo entorno al castaño como eje de desarrollo rural en El Bierzo. *Actas 6º Congreso Forestal Español*, Vitoria-Gasteiz.
- Safir GR, Boyer JS, Gerdermann JW. 1971. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science* 172: 581-583.
- Salifu K, Jacobs DJ. 2006. Characterizing fertility targets and multi-element interactions in nursery culture of *Quercus rubra* seedlings. *Annals of Forest Science* 63: 231– 237.
- Sánchez F, Honrubia M, Torres P. 2001. Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycology* 22(4): 243-258.
- Sarnari M. 2004. Monografía Ilustrada del Genere Russula in Europa. Tomos 1 y 2. A.M.B. Centro Studi Micologici. Trento.
- Savoie JM, Largeteau ML. 2011. Production of edible mushrooms in forest: trends in development of a mycosilviculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 971-979.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, ... y Griffith GW. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16): 6241-6246.
- Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED. 1964. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 51: 119-125.
- Scotland RW, Wortley AH. 2003. How many species of seed plants are there? *Taxon* 52: 101– 104.
- Sitta N, Floriani M. 2008. Nationalization and globalization trends in the wild mushroom commerce of Italy with emphasis on porcini (*Boletus edulis* and allied species). *Economic Botany* 62 (3): 307–322.
- Sitta N, Davoli P. 2012. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: International Markets and Regulations. In *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms* (pp. 355-380). Springer Berlin Heidelberg. Smith SE, Read DJ, 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press - Elsevier, London.

- Smith JE, Molina RJ, Huso MMP, Luoma DL, McKay D, Castellano MA, Lebel T, Valachovic Y. 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal carpophores in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, U.S.A. *Canadian Journal of Botany* 80: 186–204.
- Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Academic, London Soil Survey Staff.
- USDA Soil Taxonomy 1975. Agric. Handbk., 436, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.
- Srinivasan M, Natarajan K, Nagarajan G. 2000. Growth optimization of an ectomycorrhizal fungus with respect to pH and temperature in vitro, using *Design of Experiments*. *Bioprocess Engineering* 22: 267-273.
- Suz LM, Martín MP, Fischer CR, Bonet JA, Colinas C. 2010. Can NPK fertilizers enhance seedling growth and mycorrhizal status of *Tuber melanosporum* inoculated *Quercus ilex* seedlings? *Mycorrhiza* 20: 349-360.
- Suz LM, Barsoum N, Benham S, Dietrich HP, Fetzer KD, Fischer R, García P, Gehrman J, Kristöfel F, Manninger M, Neagu S, Nicolas M, Oldenburger J, Raspe S, Sánchez G, Schröck HW, Schubert A, Verheyen K, Verstraeten A, Bidartondo MI. 2014. Environmental drivers of ectomycorrhizal communities in Europe's temperate oak forests. *Mol Ecol* 23: 5628– 5644.
- Taschen E, Sauve M, Taudiere A, Parladé J, Selosse MA, Richard F. 2015. Whose truffle is this? Distribution patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities. *Environmental Microbiology* 17: 2747–2761.
- Taylor AFS. 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244: 19–28.
- Tedersoo L, Kõljalg 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(1): 153-165.
- Tedersoo L, Suvi T, Larsson E, Kõljalg U. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research* 110(6): 734-748.
- Tedersoo L, May TW, Smith, ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20(4): 217-263.
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Kõljalg U. 2010. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical

- mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* 188: 291–301.
- Trappe JM, Claridge AW, Arora D, Smit WA. 2008. Desert truffles of the African Kalahari: ecology, ethnomycology, and taxonomy. *Economic Botany* 62(3): 521–529.
- Trissl HW, Gao Y, Wulf K. 1993. Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. *Biophysical Journal* 64: 974–988.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. 1964. Flora Europaea, vol. 1-5 Cambridge University Press. Cambridge (1964–1980).
- Tyree MT, Hammel HT. 1972. The measurements of the turgor pressure and water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Journal of Experimental Botany* 23: 267–282.
- Urquijo P. 1944. Aspectos de la obtención de híbridos resistentes a la enfermedad del castaño. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* XIII: 447–462.
- Valverde-Asenjo I, García-Montero LG, Quintana A, Javier Velázquez J. 2009. Calcareous amendments to soils to eradicate *Tuber brumale* from *T. melanosporum* cultivations: a multivariate statistical approach. *Mycorrhiza* 19: 159–165.
- Vezzola V. 2005. Primi risultati produttivi con piante micorrizate da *T. macrosporum* Vittad. In: Atti Seminario sullo stato attuale della Tartuficoltura Italiana (21-22 febbraio 2004) Grafiche Millefiorini, Spoleto-Norcia, Italia, pp 51–55.
- Van Kooten O, Snel JFH. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147–150.
- Vieitez AM, San-José MC, Vieitez E. 1986. Forest and nut trees. 11. Chesnut (*Castanea* spp.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*.
- Villar-Salvador P, Planelles R, Enríquez E, Peñuelas JL. 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *Forest Ecology and Management* 196: 257–266.
- Villar-Salvador P, Puértolas J, Cuesta B, Peñuelas JL, Uscola M, Heredia Guerrero N. 2012. Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New Forest* 43: 755–770.
- Villar-Salvador P, Peñuelas JL, Nicolás-Peragón JL, Benito LF, Domínguez-Lerena S. 2013. Is nitrogen fertilization in the nursery a suitable tool for enhancing the performance of Mediterranean oak plantations? *New Forests* 44: 733–751.

- Visnovsky SB, Guerin-Laguette A, Wang Y, Pitman AR. 2010. Traceability of marketable Japanese shoro in New Zealand: using multiplex PCR to exploit phylogeographic variation among taxa in the *Rhizopogon* subgenus *Roseoli*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(1): 294–302.
- Vogt KA, Blomfield J, Ammirati JF, Ammirati SR. 1992. Sporocarp production by basidiomycetes with emphasis on forest ecosystems. In: CarrollGC, WicklowDT, eds. *The Fungal Community, its Organization and Role in the Ecosystem*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 563–581.
- Wang Y, Hall IR. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82: 1063–1073.
- Wang YX, Lu ZX. 2005. Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC 50328. *Process Biochemistry* 40(3): 1043-1051.
- Wedén C, Danell E, Tibell L. 2005. Species recognition in the truffle genus *Tuber*- the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environmental Microbiology* 7 (10): 1535-1546.
- Yang X, He J, Li C, Ma JZ, Yang Y, Xu J. 2008. Matsutake trade in Yunnan Province, China: an overview. *Economic Botany* 62(3): 269–277.
- Zak B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. *Annual Review Phytopatology* 2: 377-392.
- Zambonelli A, Branzati MB. 1990. Mycorrhizal sinthesis of *Tuber albidum* Pico with *Castanea sativa* Mill., *Quercus suber* L. and *Alnus cordata* Loisel. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 28: 563-567.
- Zambonelli A, Salomoni S, Pisi A. 1993 Caratterizzazione anatomomorfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. *Micologia Italiana* 3: 73-90.
- Zambonelli A, Salomoni S, Pisi A. 1995 Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber borchii*, *T. aestivum*, *T. mesentericum*, *T. brumale*, *T. melanosporum* su *Pinus pinea*. *Micologia Italiana* 24: 119-137.
- Zambonelli A, Iotti M, Boutahir S, Lancellotti E, Perini C, Pacioni G. 2012. Ectomycorrhizal fungal communities of edible ectomycorrhizal mushrooms. In *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms* (pp. 105-124). Springer Berlin Heidelberg.
- Zeppa S, Sisti D, Pierleoni R, Potenza L, Guescini M, Vallorani L, Stocchi V. 2005. *Tilia platyphyllos* Scop.-*Tuber brumale* Vittad. Vs *T. platyphyllos* Scop.-*T. borchii* Vittad. ectomycorrhizal systems: a comparison of structural and functional traits. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 709-716.
- Zohary D, Hopf M. 1988. *Domestication of Plants in the Old World*. Clarendon Press, Oxford.

- Zoller, H. 1960. Pollenanalytische Untersuchungen zur Vegetations geschichte der insubrischen Schweiz, Denkschriften der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. *Pollen analysis studies of vegetation history in Switzerland* 83: 45-156.
- Zotti M, Persiani AM, Ambrosio E, Vizzini A, Venturella G, Donnini D, Angelini P, Di Piazza S, Pavarino M, Lunghini D, Venanzoni R, Polemis E, Granito VM, Maggi O, Gargano ML, Zervakis GI. 2013. Macrofungi as ecosystem resources: Conservation versus exploitation. *Plant Biosystems* 147: 219-225.