

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Programa de Doctorado: “Biología aplicada a la sostenibilidad de recursos naturales
(Mención de calidad)”

**“Hongos ectomicorrícicos de plantas leñosas en terrenos degradados de
Asturias por actividad minera e industrial”**

TESIS DOCTORAL

Elena Fernández-Miranda Cagigal

Oviedo 2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Hongos ectomicorrícicos de plantas leñosas en terrenos degradados de Asturias por actividad minera e industrial	Inglés: Ectomycorrhizal fungi of woody plants on degraded lands of Asturias by mining and industrial activities
2.- Autor	
Nombre: Elena Fernández-Miranda Cagigal	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología aplicada a la sostenibilidad de recursos naturales (Mención de calidad).	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

En Asturias existen numerosas zonas con suelos pobres, degradados o contaminados debido a actividades mineras e industriales. El suelo de estas zonas suele contener metales pesados, que hace difícil e incluso imposible su recuperación forestal cuando se realizan técnicas convencionales. Numerosos trabajos están demostrando que si se revegetan zonas degradadas con árboles micorrizados se consiguen tasas de supervivencia y desarrollo muy superiores a las alcanzadas con árboles sin micorrizar, afirmando algunos autores que las ectomicorizas mejoran la resistencia de algunas especies a los metales pesados. Nuestro grupo dispone del hongo ectomicorrícico *Paxillus ammoniavirescens* capaz de micorrizar a abedul, que en trabajos previos *in vitro* ha sido capaz de crecer y acumular Cd.

Por ello se decidió realizar un muestreo de esporocarpos para disponer de más aislamientos de esta misma especie u otras también pioneras de tres zonas altamente contaminadas que fueron Nitrastur, El Terronal y Olicio, encontrándonos con un total de 27 especies diferentes. Del total, 14 especies se analizaron mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X por energía dispersa (XRF) para determinar su capacidad de acumulación de metales pesados, y seleccionar especies candidatas para su utilización en programas de fito o micorremediación. Asimismo se estudio si la temperatura de secado de las muestras afectaba al contenido de metales, determinando que el secado a 35º C resultaba el más idóneo, mientras que a 70º C el contenido de metales disminuían, probablemente por la presencia de compuestos volátiles. Adicionalmente, se determinó si los metales se acumulaban de manera diferencial entre tejidos externos e internos, encontrándose una acumulación significativamente mayor de Se, Cu y Zn en los tejidos externos. Para determinar si los análisis realizados con XRF eran fiables se validaron los resultados mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, observándose que los valores dados para el Se, Zn, Cu o Cd presentan valores similares con correlaciones elevadas o moderadas, entre ambas técnicas, mientras que para el Pb el XRF lo sobrestima y en el caso del As los subestima. Con todas estas medidas podemos decir que especies como *Amanita muscaria* de El Terronal hiperacumula Hg, *Paxillus cuprinus* de Nitrastur acumula Fe, As y Pb o *Volvopluteus gloiocephalus* de Olicio acumula Fe y As.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de las comunidades fúngicas de estas zonas seleccionamos una parcela altamente contaminada de Nitrastur, se estudiaron las raíces y rizosfera de ejemplares de abedul, sauce y chopo, determinando la presencia de 2 especies del género *Scleroderma*, 2 Ascomycetes pertenecientes al orden Helotiales, así como la presencia de hongos arbusculares. La presencia de 5 géneros de estos últimos hongos se vio confirmada adicionalmente por la producción de esporas a partir de rizosfera dos árboles en donde se había observado su presencia.

Una correcta identificación de las especies resulta crucial para poder trabajar con ellas, así que se realizó un estudio filogenético de las especies ectomicorrícicas de interés, pudiendo de esta manera ubicar nuestras especies correctamente así como identificar a uno de los Ascomycetes como *Cadophora finlandica*.

Por último se aisló y cultivo *in vitro* las especies *A. muscaria*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *S. citrinum* y *Tricholoma fulvum*, consiguiendo además micorrizar abedul *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *S. citrinum* y *T. fulvum*. Se estudio en detalle la cinética del crecimiento de las especies del género *Paxillus* en diferentes medios de cultivo, determinando que el medio MS (Murashige y Skoog), y sus modificaciones resultan los idóneos para su cultivo. Finalmente se estudio la estructura, composición, biogénesis y utilización como inóculo de los esclerocios producidos por *P. ammoniavirescens*.

RESUMEN (en Inglés)

In Asturias there are numerous areas with degraded or contaminated soils because of mining and industrial activities. The soil in these areas often contains heavy metals, what makes reforestation difficult or even impossible when conventional techniques are performed. Numerous studies show that if degraded areas are vegetated with mycorrhized trees development and survival rates are much higher than those achieved without mycorrhized trees. Some authors have determined that some species of ectomycorrhizal fungus improve plants resistance to heavy metals. Our group work with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus ammoniavirescens* which form ectomycorrhizas with birch, which in previous work *in vitro* has been able to grow and accumulate Cd.

Therefore we decided to collect fruit bodies from three highly contaminated areas: Nitrastur, El Terronal and Olicio, to have more isolates of the same species as well as other pioneering species, finding a total of 27 different species. Of the total, 14 species were analyzed by fluorescence spectrometry by energy dispersive X-ray (XRF) to determine their capacity to accumulate heavy metals and select candidate species for use in programs of phyto or mycorremediation. We also studied if the drying temperature of the samples affected the metal content, determining that 35 °C was the most suitable drying temperature, while at 70 °C the metal content decreased, probably for the presence of volatile compounds. Additionally, we determined if the metals were accumulated in a differential way between external and internal tissues, finding a significantly higher accumulation of Se, Cu and Zn in the external tissues. To determine if the analyses realized with XRF were trustworthy the results were validated by mass spectrometry source inductively coupled plasma observing that the values obtained for Se, Zn, Cu and Cd have similar values with high or moderate correlations between both techniques, while XRF overestimates Pb and underestimates As. With all these measures we can claim that species such as *Amanita muscaria* from El Terronal hyperaccumulates Hg, *Paxillus cuprinus* from Nitrastur accumulates Fe, As and Pb and *Volvopluteus gloiocephalus* from Olicio accumulates Fe and As.



With the aim of expanding knowledge of fungal communities in these areas, we selected a highly polluted parcel in Nitrastur, and studied roots and rhizosphere of specimens of birch, willow and poplar, determining the presence of 2 species of the genus *Scleroderma*, 2 Ascomycetes belonging to the order Helotiales, and also the presence of arbuscular fungi. The presence of this group of fungi was confirmed by the production of spores of 5 different genera, from the rhizosphere trees where its presence was observed.

Correct species identification is crucial to work with them, so a phylogenetic study of the ectomycorrhizal species of interest was made, which allowed us to locate our species correctly as well as identify one of the Ascomycetes as *Cadophora finlandica*.

Finally, isolation and *in vitro* culture of the species *A. muscaria*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *Tricholoma fulvum* and *S. citrinum* was achieved, and also form mycorrhizas in birch with *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *T. fulvum* and *S. citrinum*. The kinetics of growth of the species of the genus *Paxillus* in different culture media was studied, determining that the MS (Murashige & Skoog) medium and its modifications are the ideal for its cultivation. The structure, composition, biogenesis and use as inoculum of sclerotia produced by *P. ammoniavirescens* was also studied.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS

Esta tesis ha sido realizada en:

Universidad de Oviedo

Departamento de Biología de Organismos y Sistemas

Área de Fisiología Vegetal



Universidad de Oviedo

Financiación personal y de la investigación:

Beca del Vicerrectorado de Actividad Académica, Profesorado y Convergencia Europea para la matricula del periodo de investigación del tercer ciclo (Curso 2007-2008).

- Beca del Vicerrectorado de Actividad Académica, Profesorado y Convergencia Europea para la matricula del periodo de investigación del tercer ciclo (Curso 2007-2008).
- Contrato en el proyecto *Innovative and Demonstrative Arsenic Remediation Technologies for Soils* (I+DARTS).
- Proyecto de Investigación Tolerancia y acumulación de metales pesados en *Betula celtiberica*: Potencial uso en fitorremediación y Producción de Biomasa. MICINN-12-CTM2011-29972
- Proyecto de Investigación *Innovative and Demonstrative Arsenic Remediation Technologies for Soils* UE-12-IDARTS-LIFE11-000547.



*"I am the passenger. I stay under glass
I look through my window so bright"*

Iggy Pop

AGRADECIMIENTOS

Aunque parecía imposible, por fin lo logré. Está terminada. Esta tesis no es solo fruto de mi trabajo, sino de muchas personas que sabiéndolo o no, me han ayudado de una u otra manera.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi Director, Abelardo Casares Sánchez. Has sido mi mentor, mi guía en este enrevesado mundo de los hongos. Gracias por enseñarme, por tener paciencia, por escucharme, por preocuparte por mi tanto profesional como personalmente. Gracias por enseñarme a ser independiente, crítica y honrada en esta difícil profesión. Gracias una y mil veces más; solo espero que te sientas orgulloso de este trabajo ya que será la mayor recompensa que puedo alcanzar.

En segundo lugar a Aída González Díaz, por su apoyo constante tanto económico como moral, y por ser la única persona capaz de hacer que mi querido director y yo nos centráramos y avanzáramos. A Ana B. por su incansable sonrisa.

A los Doctores Concepción Azcón González de Aguilar y Javier Palenzuela Jiménez de la Estación Experimental del Zaidín perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por su ayuda y consejos a la hora de la identificación de las micorrizas arbusculares.

A Eduardo Rodríguez-Valdes por enseñarme cómo funciona el XRF, que para mi será siempre la pistola de rayos X y ayudarme con la medición de los metales.

A Santiago Serrano y Juan Rodríguez, por dejarme utilizar sus fotografías y por su inestimable ayuda en la determinación taxonómica de las setas.

Al Doctor Agustín Martín Izaola Director del Departamento de Geología de la Universidad de Oviedo, que me indicó el camino cuando el resto del mundo me decía que era imposible, y descubrí la geomicrobiología. Gracias por decirme que en ciencia no hay nada imposible solo hay cosas difíciles de explicar.

A Enrique, ¡ay! Henry la tabarra que te he dado durante todos estos años, y siempre me has ayudado, eres un grande. A Pilar, llegaste al final pero no has dejado un solo día de interesarte por como lo llevaba. Gracias.

A Miguel, mi heredero espiritual, sigue así, eres igual de cabezón y cafre (con cariño) que yo, así que espero verte dar mucha guerra.

A todos los profesores del Área de Fisiología Vegetal, por tener siempre alguna palabra amable. A todos los becarios pasados y presentes ya que de todos he aprendido algo.

A Rebe y Víctor, porque siempre habéis estado allí para cualquier cosa, ayudando sin que ni siquiera tuviera que pedirlo. A Mauro, por desquiciarse conmigo mirando picos y mas picos. Sois fantásticos.

A mi Marcos, que te voy a decir que no te haya dicho ya. Hemos sufrido esto juntos y siempre has estado al pie del cañón, y por eso y por otras muchas cosas eres uno de mis mejores amigos.

A Karen, Alberto, Karin, Martita y Jennifer, por recordarme lo injusta que es la vida por nacer en un lado del mundo, siempre seguiré la Cruz del Sur. Al gran Italo Bravo, por enseñarme desde el principio las mentiras de la ciencia, que razón tenías.

A las Impactantes, Marta, Susana, Clara, Elena, Isabel, Carmen y Cova, por obligarme a subir cuando estaba cansada, por llamarme pesada y por decirme que terminara la tesis de una vez. De todo corazón gracias chicas, empezamos siendo compañeras y ahora os considero unas amigas maravillosas.

A Rocky y Bea, por dejarme formar parte de su familia y permitirme ser la “padrina” oficial y oficiosa de Sofía y Vero.

A Irene, Marta, Marina y Rosa, mis almas gemelas, sin vosotras nada de esto sería posible. Sois un motor que me empuja a moverme, imparables y tenaces. Gracias por dejarme teneros en mi vida.

A mi familia. A mis increíbles tías, por hacerme una privilegiada al sentir que tengo más de una madre. A mi Padrino por ser la mejor persona que conozco. A mis abuelos, a su recuerdo.

A mi Abuela Adela, ni la viruela, ni la guerra acabaron con sus ganas de luchar y aprender. Esto va a tu memoria, por los kilómetros que tenías que andar hasta la escuela, por esconder libros en el monte, por luchar en una guerra y por cuidar de mi madre cuando te quedaste sola, marchándote a otro país para aguantar de nuevo otra dictadura. Por tener ese carácter infernal y meterme en la cabeza lo dura y terca que tenía que ser, lo he conseguido, y esto es para ti.

A mi madre, por sus besos y abrazos, por quererme incondicionalmente, por soportarme y por sacrificar parte de su vida por mí. A Ricardo, mi amor, mi amigo, mi mitad. Eres la persona más importante de mi vida y no sé cómo expresar todo lo que te debo. Eres maravilloso y te quiero.

Por último a lo mejor que he hecho y haré en mi vida, mis hijos Mateo y Nicolás. Ni todos los títulos y artículos del mundo valen más que el tiempo con vosotros y veros sonreír.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMA	Agencia Europea de Medio Ambiente
AEMET	Agencia Estatal de Meteorología
AIC	Criterio de Akaike
AM	Micorrizas arbusculares
BAF	Biotina-Aneurina-Ácido Fólico Agar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
dH₂O	Agua destilada
dNTP	Desoxinucleotido Trifosfato
DEC	<i>Deme Environmental Contractors</i>
DOCOMOMO	<i>Documentation and Conservation of buildings, sites and neighborhoods of the Modern Movement</i>
DSE	Endofito Septado Oscuro
EMGRISA	Empresa para la Gestión de Residuos Industriales S.A.
ETRS89	Sistema de Referencia Terrestre Europeo 1989
EEUU	Estados Unidos de América
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAA	Etanol - Formol - Ácido acético
FOREGS	<i>Forum of European Geological Surveys</i>
GSP	Alianza mundial del Suelo
GTR	<i>General Time Reversible</i>
HKY	Hasegawa-Kishiro-Yano
ICO	Instituto de Crédito Oficial
ICP-MS	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
INDUROT	Instituto de Recursos Naturales y Ordenación del Territorio
INVAM	<i>International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi West Virginia University</i>
ITS	Región de Transcripción Interna
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOCSA	Laminados Oviedo-Cordoba
NGR	Nivel Genérico de Referencia
N-J	<i>Neighbor-Joining</i>
MAGNA	Mapa Geológico de España a escala 1:50.000

MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i>
MEPA	Extracto de Malta-Peptona Agar
MFM	Medio Fries Modificado
MMN	Medio Melin Norkans Modificado
MP	<i>Malt extract peptone</i>
MR	Inferencia Bayesiana calculada mediante MrBayes
MS	Medio Murashige y Skoog
Pa L	<i>Paxillus ammoniavirescens</i> procedente de SIA COOPER S.A.-KME LOCSA
Pa N	<i>Paxillus ammoniavirescens</i> procedente de Nitrastur
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGO	Plan General de Ordenación
PGOU	Plan General de Ordenación Urbana
PNOA©	Plan Nacional de Ortofotografía Aérea
PVLG	Alcohol de polivinilo-Ac. Láctico-Glicerol
REGISA	Recreativos Gijón S.A.
RFLP	<i>Restiction Fragment Legth Polymorphism</i>
SIA Cooper	Sociedad Industrial Asturiana S.A.
SERPA	Sociedad de Servicios del principado de Asturias
TrN	Tamura-Nei
UTM	<i>Universal Transversal de Mercator</i>
VROM	<i>Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieu</i>
XRF	Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X por Energía Dispersa

Indice

1. Introducción General	1
1.1. Antecedentes y situación actual en el Principado de Asturias	1
1.2. La simbiosis micorrícica	3
1.3. Aplicación de las micorrizas	6
1.4. Planteamiento y objetivos	7
1.5. Bibliografía	8
2. Descripción de zonas contaminadas	13
2.1. Nitrastur	14
2.2. El Terronal	21
2.3. Olicio	24
2.4. SIA Cooper S.A.- KME LOCSA	26
2.5. Bibliografía	28
3. Hongos Macromycetes en zonas degradadas y acumulación de metales pesados	31
3.1. Introducción	33
3.2. Material y Métodos	34
3.2.1. Muestreo de especies	34
3.2.2. Determinación taxonómica	34
3.2.3. Análisis de metales pesados	34
3.2.4. Tratamiento estadístico	36
3.3. Resultados	37
3.3.1. Muestreo de especies	37
3.3.1.1. Nitrastur	37
3.3.1.2. El Terronal	53
3.3.1.3. Olicio	57
3.3.2. Determinación taxonómica	64

3.3.3. Análisis de metales pesados	64
3.3.3.1. Análisis del contenido de metales mediante XRF	64
3.3.3.2. Análisis ICP - MS	66
3.3.3.2.1. Efecto de la temperatura en el análisis de metales	66
3.4. Discusión	70
3.5. Bibliografía	77
4. Diversidad fúngica de las raíces y rizosfera de diferentes especies forestales en zonas altamente contaminadas	81
4.1. Introducción	83
4.2. Material y Métodos	84
4.2.1. Muestreo	84
4.2.2. Descripción macro-microscópica y recogida de muestras	85
4.2.3. Extracción de ADN genómico de ectomicorrizas	85
4.2.4. Amplificación y análisis de regiones ITS	86
4.2.5. Generación de esporas y determinación de taxonómica	87
4.3. Resultados	89
4.3.1. Muestreo	89
4.3.2. Descripción e identificación de los diferentes morfotipos de ectomicorrizas	89
4.3.3. Descripción e identificación de endomicorrizas y otros endófitos	95
4.3.4. Generación de esporas y determinación taxonómica	101
4.4. Discusión	104
4.5. Bibliografía	108
5. Estudio filogenético de los hongos ectomicorrícicos de zonas contaminadas	113
5.1. Introducción	115
5.2. Material y Métodos	116
5.2.1. Muestreo	116
5.2.2. Extracción de ADN genómico de cuerpos fructíferos	116
5.2.3. Extracción de ADN genómico de micelio	116
5.2.4. Amplificación y análisis de regiones ITS	117
5.2.4.1. Estructura del ITS1 de <i>Leccinum</i> y localización de minisatelites	117
5.2.5. Análisis filogenéticos	118

5.2.6. ITS-RFLP	119
5.3. Resultados	120
5.3.1. <i>Amanita</i>	120
5.3.2. <i>Hebeloma</i>	123
5.3.3. <i>Inocybe</i>	126
5.3.4. <i>Lactarius</i>	128
5.3.5. <i>Leccinum</i>	131
5.3.6. <i>Paxillus</i>	134
5.3.7. <i>Scleroderma</i>	138
5.3.8. <i>Tricholoma</i>	141
5.3.9. Helotiales	143
5.3.10. Familias <i>Hyalocyphaceae-Heloticeae</i>	146
5.3.11. Complejo <i>Meliniomyces-Rhizoscyphus</i>	148
5.4. Discusión	151
5.5. Bibliografía	157
6. Aislamiento, cultivo y micorrización controlada de hongos ectomicorrícicos de zonas contaminadas	169
6.1. Introducción	171
6.2. Material y Métodos	172
6.2.1. Aislamiento	172
6.2.2. Efecto del medio de cultivo en la producción de <i>P. ammoniavirescens</i> (Pa L)	172
6.2.3. Variación del pH en diferentes medios causado por el crecimiento de <i>P. ammoniavirescens</i> (Pa L)	174
6.2.4. Crecimiento de los hongos de Nitrastur en medio MS	174
6.2.5. Efecto del medio de cultivo en la producción de <i>P. cuprinus</i>	174
6.2.6. Material vegetal	175
6.2.7. Síntesis de micorrizas <i>in vitro</i>	175
6.2.8. Descripción Macro y Microscópica de las micorrizas	176
6.2.9. Esclerocios de <i>P. ammoniavirescens</i>	176
6.2.9.1. Estructura del esclerocio	177
6.2.9.2. Esclerocios como fuente de inóculo	177
6.2.9.3. Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de esclerocios	177
6.2.10. Tratamiento estadístico	178

6.3. Resultados	179
6.3.1. Aislamiento	179
6.3.2. Efecto del medio de cultivo en la producción de <i>P. ammonivirescens</i> (Pa L)	179
6.3.3. Variación del pH en diferentes medios causado por el crecimiento de <i>P. ammonivirescens</i> (Pa L)	182
6.3.4. Crecimiento de los hongos de Nitrastur en medio MS	183
6.3.5. Efecto del medio de cultivo en la producción de <i>P. cuprinus</i>	185
6.3.6. Síntesis de micorrizas <i>in vitro</i>	186
6.3.7. Descripción Macro y Microscópica de las micorrizas	187
6.3.8. Esclerocios de <i>P. ammoniavirescens</i>	193
6.3.8.1. Estructura del esclerocio	193
6.3.8.2. Esclerocios como fuente de inóculo	196
6.3.8.3. Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de esclerocios	197
6.4. Discusión	198
6.5. Bibliografía	202
Conclusiones	207
Apéndices	209
Apéndice 1	211
Apéndice 2	213
Apéndice 3	214
Apéndice 4	215



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Introducción General

1.1. Antecedentes y situación actual en el Principado de Asturias

El suelo es uno de los recursos naturales más sensibles y vulnerables a la contaminación. Según la Alianza Mundial del Suelo (GSP) perteneciente a la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el suelo es un recurso natural finito, no renovable, base del desarrollo agrícola y sostenible. Da fundamento a los alimentos, los piensos, los combustibles, las fibras, la disponibilidad de agua, el ciclo de nutrientes, las existencias de carbono orgánico y la biodiversidad, además de ofrecer una plataforma para la construcción. La superficie de suelo fértil es limitada y está sometida a una presión cada vez mayor debido al cambio climático y a los usos inadecuados del suelo y en competencia entre sí, que redundan en una degradación cada vez mayor, considerándose que en la actualidad el 46% de las tierras del mundo están degradadas (GSP, Septiembre 2011).

En los años 70 se empezó a tomar conciencia del peligro de los suelos contaminados tras catástrofes como la acaecida en *Love Canal* en el estado de Nueva York (EEUU), por el vertido masivo de residuos químicos por la empresa *Hooker Chemical and Plastics Corporation*, que incluían productos tóxicos, sobre los que se construyeron una presa, barrios residenciales y colegios, lo que provocó el incremento de los casos de cáncer y las malformaciones congénitas hasta el punto de tener que evacuar la ciudad (Goldman *et al.*, 1985; Levine, 1982). En Europa se dio el caso de Lekkerkerk en Holanda, donde se encontraron barriles de tolueno, xilenio y benceno enterrados en el subsuelo de la ciudad, lo que desencadenó graves consecuencias ecológicas, sanitarias y económicas. Tras estos sucesos, los gobiernos han ido desarrollando y adoptando diferentes políticas para gestionar los suelos contaminados de su territorio. En el caso de Holanda a raíz de esta tragedia se aprobó en 1982 la primera ley específica de suelos contaminados, "*Soil Clean-Up Act*", siendo este país actualmente el que posee la legislación más avanzada en esta materia (*Soil Remediation Circular* 2009. VROM).

En la Conferencia de Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo de Río de Janeiro, de 1992, se reconoció la importancia de la protección de los suelos y de sus usos potenciales en el contexto de un desarrollo sostenible, en particular contra la contaminación procedente de acciones o actividades de origen antrópico. En 1999, la Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) estimó entre 300.000 y 1.500.000 el número de zonas contaminadas en Europa occidental. La Unión Europea, consciente de la importancia de los suelos y la necesidad de frenar su degradación, en su sexto programa de acción en materia de medio ambiente, instó a la elaboración de una estrategia temática sobre la protección de los suelos que se presentó en el año 2006 junto con la propuesta de Directiva Marco para la Protección del Suelo. En ellas se proponen objetivos comunes para prevenir la degradación del suelo, preservar las funciones de éste y rehabilitar los suelos degradados. La propuesta de Directiva prevé, en particular, la definición de las zonas de riesgo por parte de los Estados miembros, la elaboración de inventarios de los terrenos contaminados, así como la rehabilitación de los suelos degradados conforme a una estrategia nacional que fije las prioridades. En España, la legislación vigente al respecto se basa en la ley de residuos y suelos contaminados de 22/2011, de 28 de julio y el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo, los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

Según el Real Decreto 9/2005 se define suelo contaminado como "*aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable*

para la salud humana o el medio ambiente". La actividad industrial, la minera, los sistemas agrarios intensivos, y las infraestructuras han generado emisiones y vertidos que han elevado los niveles de estas sustancias en el suelo (Yang *et al.*, 2005).

Unas de las sustancias contaminantes más peligrosas causadas por este tipo de actividades son los metales pesados. La AEMA (1999) los define como los metales y metaloides con una densidad mayor de 4,5 g/cm³. Dada su naturaleza estable, los metales pesados son un grupo de contaminantes muy persistentes en el suelo. De los 118 elementos, 49 son metales pesados. No todos los metales de densidad alta son especialmente tóxicos en concentraciones normales como pueden ser el hierro (Fe), molibdeno (Mo), zinc (Zn) y manganeso (Mn), que son micronutrientes esenciales. Sin embargo, otros son tóxicos a baja concentración y no poseen función conocida, como son la plata (Ag), arsénico (As), mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb) y antimonio (Sb) (Niess, 1999). La peligrosidad de los metales pesados reside en que no pueden ser degradados ni química, ni biológicamente (Kabata-Pendias, 2000) y además tienden a bioacumularse provocando efectos tóxicos de muy diverso carácter. Elevadas concentraciones en el suelo de estos metales sean o no esenciales pueden producir síntomas de toxicidad en plantas, ya que desplazan a los elementos esenciales e inhiben la actividad proteica causando, por ejemplo, inhibición del crecimiento (Van Assche y Clijster, 1990). En el ser humano se han descrito infinidad de problemas físicos (cáncer, daños en el riñón, autoinmunidad, etc) y efectos psíquicos (ansiedad, pasividad, etc).

De acuerdo con el informe del Centro de Coordinación de Efectos (Posch *et al.*, 2005), la distribución y la magnitud de la deposición de estos elementos pone a grandes áreas de ecosistemas europeos en grave riesgo. Este hecho se pone de manifiesto en el Atlas Geoquímico de Europa (Fig.1.1.) (de Vos y Tarvainen, 2006) y en los resultados de Lado *et al.* (2008), que realizan un estudio geoestadístico a partir de los datos de los 26 países que conforman el *Forum of European Geological Surveys* (FOREGS), poniendo de manifiesto la elevada extensión de terreno afectado y la clara correlación entre altas concentraciones de Cd, Cu, Hg, Pb y Zn, actividades industriales y agricultura intensiva.

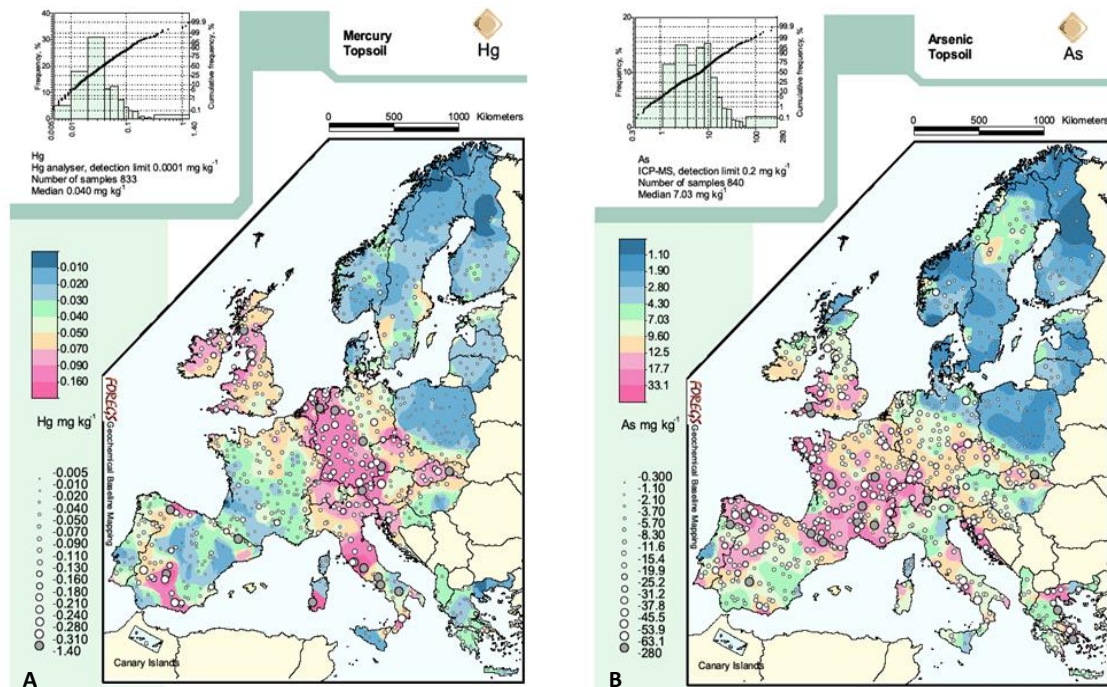


Fig.1.1.: Mapas del Atlas Geoquímico Europeo mostrando la distribución de Hg (A) y As (B) en suelo superficial.

En Asturias existen numerosas zonas con suelos contaminados debido al intenso pasado minero (carbón y minería metálica) e industrial (química, siderúrgica y metalúrgica) de la región. Según la Cartografía Temática Ambiental del Principado de Asturias del Instituto de Recursos Naturales y Ordenación del Territorio (INDUROT), existen unas 7.523 ha de terrenos alterados. De ellos, según el último cálculo recogido por el Principado de Asturias, existen 268.700 m² contaminados, lo que representa casi el 3% de la superficie del Principado. Uno de los mayores problemas añadidos es que estos emplazamientos se encuentran en muchas ocasiones cercanos o incluso integrados en el tejido urbano, y en otras, aislados pero en ámbitos valiosos desde el punto de vista natural o del desarrollo rural. Es por ello que resulta de suma importancia la recuperación de estos suelos.

Las técnicas que actualmente se utilizan para la eliminación de estos metales y restauración de estas zonas son la excavación y almacenamiento de suelos, así como el lavado y la separación física o química de los contaminantes. El Real Decreto 9/2005, sin embargo establece una *“jerarquización de las técnicas disponibles, priorizando la recuperación “in situ” frente a las demás soluciones de descontaminación. En el caso de que por razones justificadas de carácter técnico, económico o medioambiental no sea posible esa recuperación, se podrán aceptar soluciones de recuperación tendentes a reducir la exposición, siempre que incluyan medidas de contención o confinamiento de los suelos afectados. Únicamente, como último recurso, se podrán contemplar técnicas de extracción, traslado y eliminación como residuo del suelo contaminado”*. Es por ello que se hace necesario desarrollar nuevas técnicas más rentables, seguras e inoñas como pueden ser la fito y micorremediación, que consiste en la utilización de plantas y hongos, por separado o conjuntamente mediante el establecimiento de las asociaciones micorrízicas, que sean capaces de acumular altas concentraciones de metales en sus tejidos o que al menos los toleren permitiendo la reforestación de estas áreas.

1.2. La simbiosis micorrízica

El término micorriza fue acuñado por el botánico alemán Albert Berthold Frank en 1885, definiéndolo como una asociación simbiótica entre raíces (*rhizos*) de plantas y ciertos grupos de hongos (*mycos*) del suelo, y en la que ambos miembros de la asociación se benefician y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes (*Mykorrhizen*). Brundrett (2004) redefine el término micorriza como asociaciones simbióticas esenciales para una o ambas partes, entre un hongo (especializado para la vida en suelos y plantas) y una raíz (u otro órgano de contacto con el sustrato) de una planta viva, y que son las principales responsables de la transferencia de nutrientes. Esta definición se basa en características de desarrollo y funcionales que distinguen y unifican a las micorrizas, y que se resumen en 5 criterios (Brundrett, 2009):

1. La estructura y el desarrollo de las hifas de los hongos micorrízicos se altera sustancialmente en presencia de raíces de las plantas hospedadoras. Las hifas que habitan en las raíces son estructural y funcionalmente diferentes a las desarrolladas en el suelo por el mismo hongo.
2. Las micorrizas requieren un contacto íntimo entre las hifas y las células de la planta en una interfaz cerrada donde se produce el intercambio de nutrientes.
3. La función principal de las micorrizas es la transferencia de nutrientes minerales del hongo a la planta. En la mayoría de los casos también es importante la transferencia de metabolitos entre planta y hongo (mutualismo).

4. Las micorrizas requieren un desarrollo sincronizado entre planta-hongo para el intercambio de nutrientes ya que normalmente las hifas solo colonizan las raíces jóvenes en las asociaciones mutualistas.
5. Las plantas controlan la intensidad de la micorrización mediante el crecimiento de nuevas raíces, la digestión de hifas viejas presentes en el interior de las células vegetales o mediante la formación de un sistema radicular alterado.

Esta nueva definición ha permitido reducir los tipos de micorrizas de los 7 que presentaban Harley y Harley (1987) (Arbusculares, Ectomicorrizas, Arbutoides, Monotroides, Ericoides y Orquidioides) a los actuales, aunque mucho más complejos, 5 tipos (Brundrett, 2004):

- Micorrizas arbusculares: constituidas por los hongos Glomeromycota, capaces de generar arbuscúlos, hifas y vesículas dentro de las células de la corteza de la raíz, extendiéndose las hifas de manera lineal, Tipo *Arum* (Fig.1.2.A) o en espiral formando ovillos, Tipo *Paris* (Fig.1.2.B) (Gallaud, 1905). Dentro de estas últimas se diferencian 3 subcategorías, las arrosariadas (*Beaded*) que generan en la raíz pequeñas constricciones que la hacen parecer un rosario, las corticales que solo presentan arbuscúlos dentro de una capa de las células corticales y las explotadoras (*Exploitative*) presentes en plantas mico-heterótrofas. Todas estas asociaciones se definen por la presencia de arbuscúlos, aunque en ocasiones sean extremadamente difíciles de localizar. Actualmente se estima que un 73,3% de las plantas presentan este tipo de asociación de manera regular y un 1,9% pueden poseerla o no (Brundett, 2009).

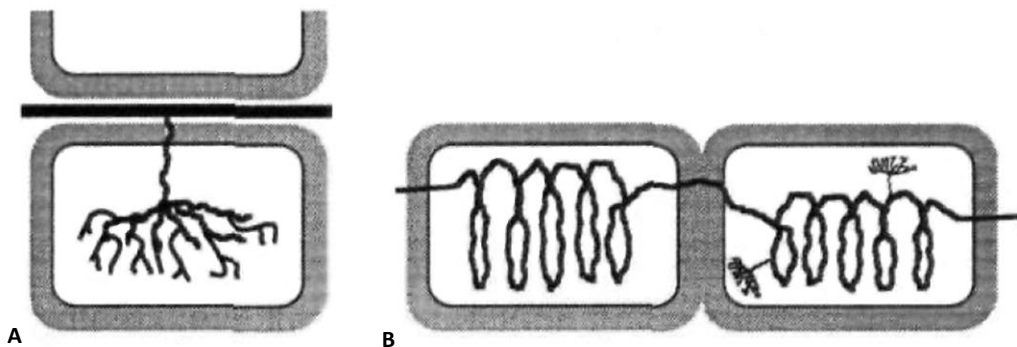


Fig.1.2.: Esquema de Smith y Smith (1997), de los diferentes tipos de micorrizas arbusculares: A) Tipo *Arum* y B) Tipo *Paris*.

- Ectomicorrizas: constituidas por Asco, Basidio y Zygomycetes, en las que un manto de hifas encierra a las raíces laterales cortas y se genera una laberíntica red de hifas entre las células de la raíz denominada red de Hartig. Dependiendo de la extensión de la red de Hartig, éstas se dividen en Corticales (la red discurre por las células del córtex) (Fig.1.3.B) o Epidérmicas (solo se limita a estas células) (Fig.1.3.A). Estas últimas, además, se dividen en las que presentan células de transferencia (Chamber *et al.*, 2005), las monotroides presentes en Ericaceae donde las hifas penetran en las células epidérmicas, y las arbutoides también presentes en Ericaceae y con la penetración de las hifas en las células epidérmicas pero formando ovillos. Brundett (2009) estima que tan solo un 4,5% del total de plantas presentan este tipo de asociación, aunque su importancia radica en su presencia en plantas de interés agroforestal (Marx y Cordell, 1989).

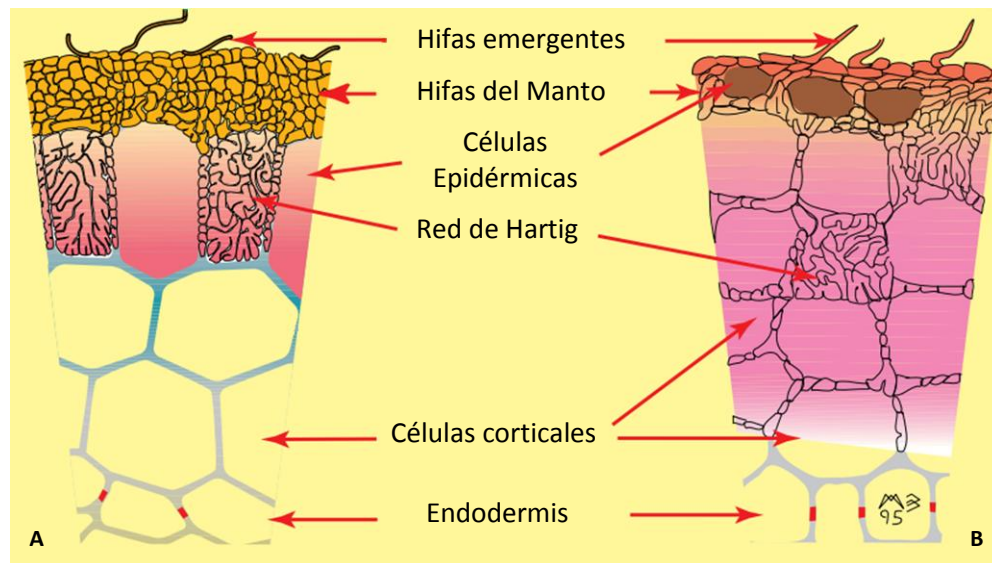


Fig.1.3: A) Ectomicorriza epidérmica, B) Ectomicorriza cortical. Esquema adaptado a partir de las ilustraciones del libro *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture* (Brundrett et al., 1996).

- Orquidioides: constituidas por Basidiomycetes en la mayoría de los casos asociados a *Rhizoctonia* y solo presentes en las plantas de la familia Orchidaceae en las que las hifas penetran generando ovillos o bobinas en las células vegetales. A su vez, éstas se dividen en 3 tipos, las de raíz que penetran en las células del córtex, las de tallo donde las hifas penetran en tallo y/o rizoma y las denominadas explotadoras (*Exploitative*) que establecen asociaciones con orquídeas mico-heterótrofas. Estas asociaciones tan solo se presentan en el 0,7% de las plantas.
- Ericoides: constituidas por Asco (Helotiales) y Basidiomycetes, se caracterizan por la penetración celular de las hifas en raíces muy finas de plantas de la familia Ericaceae. Estas asociaciones se presentan en el 1,2% de las plantas.
- Sub-Epidérmicas: presentes solo en los lirios australianos del género *Thysanotus* (Laxmaniaceae) donde las hifas de los hongos crecen en una cavidad debajo de las células epidérmicas, y de las que se desconoce la identidad del hongo formador (Brundrett y Abbott, 1991).

Aún con esta exhaustiva clasificación, todavía existen asociaciones entre planta-hongo inciertas y difíciles de definir como es el caso de los denominados endófitos septados oscuros (DSE), capaces de adoptar diferentes funciones (mutualista, patógeno o saprófito) (Jumpponen, 2001; Peterson et al., 2008). Un ejemplo de la complejidad de las asociaciones que son capaces de establecer los hongos, y no solo con las plantas, es el caso de *Geosiphon pyriformis*, hongo Glomeromycota que establece una asociación endosimbiótica con cianobacterias *Nostoc* alojadas en el interior de vejigas de unos 2 mm de tamaño, y que solo aparecen en una región muy concreta de Alemania (Schüßler y Wolf, 2005).

Las micorrizas no adquieren su importancia únicamente por su efecto sobre el simbionte arbóreo sino también desde un punto de vista ecológico, ya que los hongos ectomicorrícicos establecen complejas relaciones con otros microorganismos (Ingham y Molina, 1991) y pueden afectar al establecimiento, estructura, composición y dinámica de las comunidades vegetales (Molina et al., 1991). Es necesario un mayor estudio de estas interacciones a fin de comprender el papel real que desempeñan en un determinado ecosistema.

1.3. Aplicación de las micorrizas

Entre los beneficios que producen los hongos micorrícicos en las plantas se pueden destacar los siguientes: facilitan la nutrición y toma de agua, mejoran la tolerancia frente al estrés hídrico y salino, favorecen el crecimiento y desarrollo, e incluso pueden actuar contra los agentes patógenos (Honrubia *et al.*, 1992).

Las principales estrategias seguidas en los últimos años para la utilización de ectomicorrizas han sido orientadas tanto hacia la producción de plantas como hacia la producción de hongos (Álvarez, 1991). Uno de los grandes campos en la aplicación de las ectomicorrizas es el de producción de planta de calidad para reforestación y para la recuperación de zonas alteradas y contaminadas mediante la fito y la micorremediación.

Se ha demostrado que algunos hongos, entre ellos los micorrícicos, promueven la inmovilización mediante la precipitación de metales micogénicos como los oxalatos o la unión a ligando, así como la biosorción pasiva (paredes celulares) y acumulación en su biomasa (Formina *et al.*, 2005) (Fig.1.4.). Por otra parte, las micorrizas son capaces de incrementar la fitoextracción, bien directa o indirectamente, incrementando la acumulación del metal en la planta o mediante una mayor producción de biomasa (Fernández *et al.*, 2008).

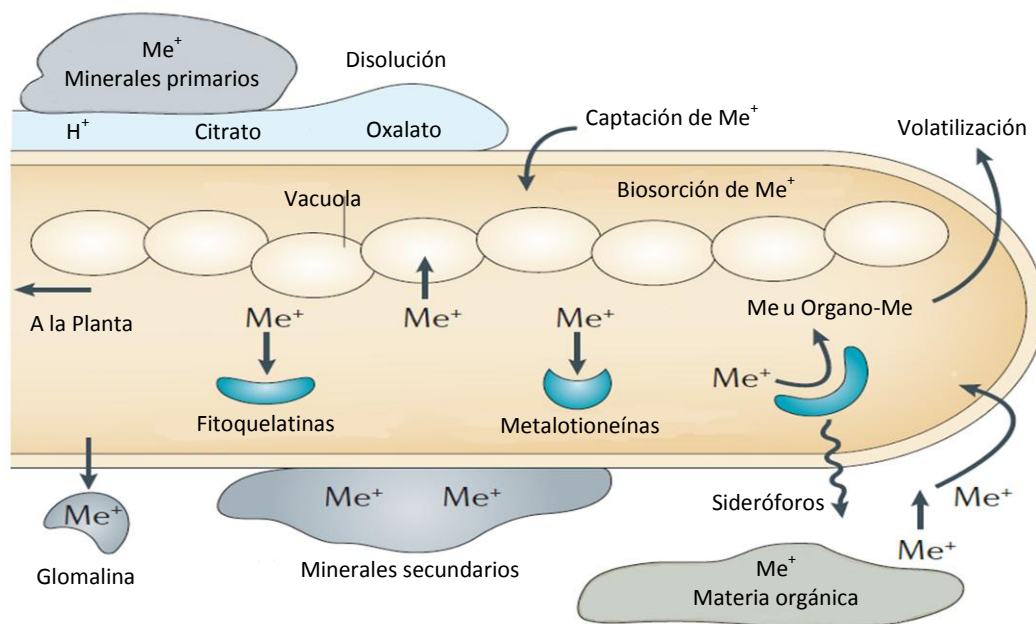


Fig.1.4.: Esquema de todas las interacciones conocidas entre los metales (Me) y los hongos. Ilustración adaptada de Harms *et al.*, 2011.

Cada especie de hongo puede utilizar uno o varios de estos mecanismos, presentando diferentes respuestas en algunos casos ante la exposición a una metal. Así pues, mientras que especies como *Candida glabrata* o *Schizosaccharomyces pombe* ante la presencia de Cd producen fitoquelatinas y metalotioneínas (Ow *et al.*, 1994), en *Paxillus involutus* estas moléculas aparecen escasamente y lo que se ve bruscamente incrementado es el glutatión (Courbot *et al.*, 2004).

Aunque parece que la capacidad de tolerancia y acumulación de las diferentes especies de hongos es un carácter intrínseco, en numerosas ocasiones se ha observado que las especies o ecotipos aislados de zonas contaminadas responden mejor ante la presencia de metales pesados (Gadd, 2007).

La correcta identificación, aislamiento, cultivo y producción de aquellas especies fúngicas que sean capaces de acumular, tolerar y mejorar el crecimiento o acumulación de las plantas empleadas resulta crucial como paso previo a los programas de fito y micorremediación.

1.4. Planteamiento y objetivos

En base a la problemática planteada, el objetivo general que planteamos en esta Tesis es la selección de hongos micorrícicos adaptados a las condiciones de zonas contaminadas por metales pesados, tipos de asociaciones existentes, aislamiento, producción, generación de nuevas formas de inóculo, así como la optimización de las técnicas de micorrización controlada con las especies aisladas.

Para la consecución de la Tesis se abordarán los siguientes objetivos parciales:

- Estudio pormenorizado de las características bio y geológicas de 4 zonas contaminadas en el Principado de Asturias (Nitrastur, El Terronal, Olicio y LOCSA-Sia Cooper).
- Muestreo de estas áreas para la recolección de hongos Macromycetes, especialmente de hongos ectomicorrícicos, adaptados a las condiciones edafoclimáticas de interés. Análisis del contenido en metales de los cuerpos fructíferos recolectados.
- Estudio de las raíces y la rizosfera de individuos de las especies *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra* presentes en una parcela especialmente contaminada, con el fin de identificar los tipos de asociaciones y especies presentes.
- Confirmación de la identidad de todas las especies ectomicorrícicas asociadas a *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *P. nigra*, mediante el análisis filogenético de las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Adicionalmente se estudió la utilización de marcadores moleculares tipo ITS-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) como método rápido de comprobación y posterior seguimiento de especies.
- Aislamiento y cultivo *in vitro* de las especies encontradas, para su posterior selección como inóculo, lo que conllevaría la optimización de las condiciones nutricionales de crecimiento y tipo de inoculación. Capacidad infectiva *in vitro* de las especies de hongo seleccionadas frente a diferentes hospedadores como *B. celtiberica*, *P. nigra* y *S. atrocinerea*. Y por último, estudio de la estructura y biogénesis de los esclerocios de *Paxillus ammoniavirescens*, así como su posible utilización como inóculo.

1.5. Bibliografía

- [AEMA] (1999). El Medio Ambiente en la Unión Europea en el umbral del Siglo XXI. Apéndice al Resumen Hechos y resultados sobre los problemas medioambientales. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, © AEMA, Copenhague.
- Álvarez, I. (1991). Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las ectomicorrizas. En: Olivares, J. y Barea, J.M. (Eds). Fijación y movilización biológica de nutrientes. CSIC. Madrid. 2:247-249.
- B.O.E. (2005). Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- B.O.E. (2011). Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- Brundrett, M.C. y Abbott, L.K. (1991). Roots of jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Austral J Bot.* 39:445-457.
- Brundrett, M.C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 79:473-495.
- Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil.* 320:37-77.
- Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M., Leroy, P. (2004). Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol.* 70:7413-7417.
- de Vos, W. y Tarvainen, T. (2006). Geochemical atlas of Europe part 2: interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps and related publications Vol. 2 of Geochemical Atlas of Europe, EuroGeosurveys & Foregs, Espoo, Finland.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2006). Directiva 2006/12/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 5 de abril de 2006 relativa a los residuos.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, RS. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environ Pollut.* 152:522-529.
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J.M., Melville, K., Alexander, I.J., Gadd, G.M. (2005). Role of oxalic acid over-excretion in toxic metal mineral transformations by *Beauveria caledonia*. *Appl Environ Microbiol.* 71:371-381.
- Frank, A.B. (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* 3:128-145.
- Gadd, G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 3:3-49.

- Gallaud, I. (1905). Études sur les mycorrhizes endophytes. *Rev Gén Bot.* 17:5-48, 66-83, 123-136, 223-239, 313-325, 425-433, 479-500.
- Gobierno del principado de Asturias. *Cartografía Temática Ambiental (1989-1998)*. Mapas de Vegetación, Litología, Roquedos, Habitación del Oso - mapa y memoria, escala 1:25.000.
- Goldman, L.R., Paigen, B., Magnant, M.M., Highland, J.H. (1985). Low birth weight, prematurity and birth defects in children living near the hazardous waste site, Love Canal. *Hazard. Waste Hazard. Mater.* 2:209-223.
- [GSP] (2011). Summary Report and Way Forward of the launch event 7-9 September, FAO Headquarters, Rome, Italy.
- Harley J.L. y Harley E.L. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British Flora. *New Phytol.* 105: 1-102.
- Harms, H., Schlosser, D., Wick, L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* 9:177-192.
- Honrubia, M., Torres, P., Diaz, G., Cano, A. (1992). Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54. Murcia.
- Ingham, E.R. y Molina, R. (1991). Interactions between mycorrhizal fungi, rhizosphere organisms, and plants. En: Barbosa, P. (Ed). *Microorganisms, Plants and Herbivores*. John Wiley and Sons, NY. pp. 169-197.
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza.* 11:207-211.
- Kabata-Pendias, A. (2000). The Anthroposphere. En: *Trace elements in Soils and Plants*. 3rd Edition. CRC Press. Boca Raton, Florida pp 3-26.
- Lado, L.R., Hengl, T., Reuter, H.I. (2008). Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. *Geoderma*, 148:189-199.
- Levine, A.G. (1982). *Love Canal: Science, politics, and people* Lexington, MA: Lexington Books, pp. 198.
- Niess, D.H. (1999). Microbial heavy metal resistance. *Applied Microbiol. Biotech.* 51:730-750.
- Marx, D.H. y Cordell, C.E. (1989). The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practise. En: Wippa, J.M. y Lumsdem, R.D. (eds.). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge Univ. Press. Cambridge, pp.1-25.
- Molina, R., Massichotel, H., Trappe, J.M. (1991). Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. Abstract of the Third European Symposium on Mycorrhizas. *Mycorrhizas in Ecosystems- Structure and Function*. August, 1991. Sheffield, England, pp.44.

-
- Ow, D.W., Ortiz, D.F., Speiser, D.M., Mccue, K.F. (1994). Molecular genetic analysis of cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. En: Winkelmann, G., Winge, D.R. (Eds). Metal Ions in Fungi. Marcel Dekker, New York, pp. 339-359.
- Peterson R.L., Wagg, C., Pautler, M. (2008). Associations between microfungus endophytes and roots: do structural features indicate function?. *Botany*. 86:445-456.
- Posch, M., Sloopweg, J., Hettelingh, J.P. (2005). European critical loads and dynamic modelling: CCE status report 2005.
- Schüßler, A. y Wolf, E. (2005). *Geosiphon pyriformis* - a glomeromycotan soil fungus forming endosymbiosis with cyanobacteria. En: Declerck, S., Strullu, D-G., Fortin, A. (Eds.). *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 271-289.
- Smith, F.A. y Smith, S.E. (1997). Tansley Review No. 96. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 137:373-388.
- Van Assche, F. y Clijstres, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13:195-206.
- V.R.O.M. (1983). Soil Clean-up Act (Interim) (Interimwet Bodem Sanering) Netherlands.
- V.R.O.M. (2009). The Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and the Environment. Soil remediation circular. Netherlands.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Treace Elem Med Biol.* 18:339-353.



CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS CONTAMINADAS

2. Descripción de las zonas de contaminadas

Debido al pasado industrial del Principado de Asturias, existen numerosos emplazamientos antiguamente ocupados por instalaciones mineras, metalúrgicas o industriales que actualmente se encuentran clausurados y en estado de ruina. El suelo de estas zonas suele contener metales pesados, alcanzando en algunos casos valores lo suficientemente elevados para que dichos emplazamientos hayan sido clasificados como suelos contaminados al haber superado el Nivel Genérico de Referencia (NGR) para estas sustancias. El Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados define NGR como “la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas”.

En la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados se indica en el artículo 35 que las comunidades autónomas tienen que declarar, delimitar y hacer un inventario de los suelos contaminados. El Gobierno del Principado de Asturias procedió a la caracterización de emplazamientos, estableciendo el grado de contaminación que presentaban y sus necesidades de saneamiento. Como consecuencia de los trabajos realizados en la fase I del inventario, se obtuvo una base de datos con un total de 694 emplazamientos con un potencial de riesgos a tener en cuenta desde el punto de vista de los suelos contaminados. Del total de los emplazamientos, se seleccionaron 12 para su caracterización, correspondiendo, la mayor parte de ellos, a emplazamientos de la minería metálica en Asturias, en especial explotaciones de mercurio. Tres de ellos (Fig.2.1.), Nitrastur (Concejo de Langreo), El Terronal (Concejo de Mieres) y Olicio (Concejo de Cangas de Onís), que actualmente se encuentran con expedientes iniciados de declaración de suelo contaminado, han sido los escogidos para la recolección y estudio de los hongos presentes en zonas contaminadas. Adicionalmente se presentan los datos disponibles de la antigua escombrera de las empresa SIA Cooper y KME LOCSA (Concejo de Siero), estudiada en la fase I del inventario y que actualmente se encuentra urbanizada. En el año 2003 se recolectó en este emplazamiento la especie *Paxillus ammoniaevirescens*, con la que se iniciaron varios trabajos (Fernández *et al.*, 2008).



Fig.2.1.: Mapa de Concejos del Principado de Asturias. En rojo aparecen los concejos a las que pertenecen las zonas de estudio.

2.1. Nitrastur

La parcela ocupada por las antiguas instalaciones de Nitrastur está situada en el distrito urbano de La Felguera (Fig.2.2.) en el Concejo de Langreo, accediéndose desde la carretera AS-117. La superficie total de las instalaciones es de 67.000 m² según la Revisión Parcial del Plan General de Ordenación (PGO) del Municipio de Langreo, repartidos en una parcela de casi 20 hectáreas. Urbanísticamente, según el PGO los terrenos del emplazamiento se encuentran clasificados como Suelo Urbano No Consolidado, por lo que para integrarse en la trama urbana se requeriría el desarrollo de acciones específicas de urbanización.



Fig.2.2.: Ortofoto general de la localización de Nitrastur. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

Entre los años 1950 y 1954 la Sociedad Ibérica del Nitrógeno, más tarde renombrada como Nitratos Asturianos (Nitrastur) construye esta fábrica con el objetivo de aprovechar mediante el método Claude los gases de las baterías de cok de la Sociedad Metalúrgica Duro Felguera. Para ello, los suelos originales de la parcela, situada entre los ríos Candín y Nalón, fueron rellenados con materiales antrópicos para lograr una superficie elevada y llana y poder edificar sobre ella. A partir de 1955 la fábrica sufrió sucesivas ampliaciones que condujeron a la actual ocupación del terreno lo que derivó en nuevos rellenos. Actualmente se calcula que más de la mitad de esta superficie corresponde a rellenos antrópicos de unos 4 a 5 m de espesor como se refleja en el Inventario y Caracterización de suelos contaminados que realizó el Principado de Asturias en 2001. Estos rellenos están constituidos por residuos industriales de las diferentes actividades existentes en el entorno:

- Siderúrgicos (escorias de altos hornos de Duro Felguera).
- Minería (residuos de lavado de carbón y escorias).
- De la propia Nitrastur o de su factoría hermana que la Sociedad Ibérica del Nitrógeno tenía en la Vega (piritas inquemadas o parcialmente quemadas y cenizas).

Pocos años antes de su cierre en 1992, Nitrastur paso a manos de Explosivos Río Tinto (mas tarde denominada MAXAM) quedando clausurada en 1997. Actualmente la mayor parte del emplazamiento pertenece a Iberdrola que la administra, siendo REGISA (Recreativos Gijón S.A.) el propietario del resto.

Esta factoría se dedicó desde su puesta en marcha a la producción de abonos nitrogenados, siendo los productos principales nitrato amónico, sulfato amónico y soluciones amoniacaes obtenidas a partir de la reacción química del amoniaco con acido nítrico o sulfúrico fabricados en la propia factoría. Las líneas de proceso principales que se utilizaron fueron:

- Obtención de ácido sulfúrico basada en la tostación de pirita.
- Fabricación de ácido nítrico mediante oxidación catalítica del amoniaco.
- Fabricación de sales amoniacaes (nitratos y sulfatos), por neutralización de los ácidos correspondientes con amoniaco.

Debido a ello, los suelos de origen natural se encuentran igualmente contaminados como resultado de décadas de actividad industrial, vertido de residuos y emisiones de la combustión en los hornos de la factoría. Se distinguen varias zonas marcadas por el tipo de actividad que realizaban:

- Zona de fabricación de H_2SO_4 (instalaciones demolidas) donde se observan rellenos de gravas y arenas rojizas que se identifican como inquemados y cenizas de pirita (Fig.2.3.).



Fig.2.3.: Restos de cenizas e inquemados de pirita encontrados en la zona superficial de Nitrastur.

- Zona de NH_3 y HNO_3 (instalaciones demolidas) donde puede haber restos debido a derrames por fallos en las conducciones.
- Zona de almacenes de abonos ternarios, materias primas, sulfato amónico, nitrato amónico (instalaciones parcialmente demolidas).
- Zona de gasógenos donde se encuentran numerosas soleras de antiguos depósitos, así como de la planta de desulfuración (instalaciones parcialmente demolidas).
- Zonas de talleres en donde se ha detectado la presencia de hidrocarburos (Fig.2.4.), gasolinera y depósitos de gasoil, aparcamientos y garaje de máquinas.



Fig.2.4.: Detalle de los hidrocarburos encontrados entre el taller de abonos ternarios y el almacén de materias primas.

- Zona de viviendas para empleados, hotel de ingenieros, vestuarios, oficinas y laboratorio.

Adicionalmente, tras la clausura de la fábrica este emplazamiento ha sido utilizado como vertedero incontrolado de diferentes restos antrópicos (Fig.2.5.) (basura, escombros, etc).



Fig.2.5.: A) Vertido de un polvo blanco no identificado, B) Tierra removida en la que se observan escombros.

Arquitectónicamente, la fundación internacional Docomomo (*Documentation and Conservation of buildings, sites and neighbourhoods of the Modern Movement*) cuyo objetivo es inventariar, divulgar y proteger el patrimonio arquitectónico del Movimiento Moderno, incluye a Nitrastur como uno de los mejores ejemplos en España de este movimiento, con mención especial para 4 elementos que permanecen aún en pie: el depósito de nitratos, el almacén de sulfatos (Fig.2.6.A), la chimenea de refrigeración (Fig.2.6.B) y la marquesina de los vehículos, que fueron además catalogados por el Ayuntamiento de Langreo como Patrimonio Industrial.



Fig.2.6.: A) Interior del almacén de sulfatos, B) Chimenea de refrigeración.

Consultado el mapa geológico de España a escala 1:50.000 (MAGNA) del Instituto Geológico y Minero de España, el área de estudio se encuentra situada en la Cuenca Carbonífera Central de Asturias. El relleno antrópico descansa sobre materiales cuaternarios correspondientes al aluvión del río Nalón. Bajo estos se encuentra ya el Carbonífero de edad Westfaliense D, con una litología de pizarras, areniscas y carbón (Paquetes Entrerregueras y Sorriego).

Fitogeográficamente, de acuerdo con Díaz y Fernández (2007), la zona se puede considerar como Región Eurosiberiana, Provincia Atlántica Europea, Subprovincia Cántabro-Atlántica, Distrito Ovetense Litoral, Sector Galaico-Asturiano, Subsector Ovetense. Bioclimáticamente, según la cartografía de Rivas-Martínez *et al.* (2004), se encontraría dentro del macroclima templado oceánico submediterráneo. Termoclimáticamente, la zona corresponde al piso bioclimático meso-templado submediterráneo. Según el análisis de series históricas de datos meteorológicos entre 1970-2009 proporcionadas por la red nacional de observación meteorológica de la Agencia Estatal de Meteorología del Gobierno de España (AEMET), y recogidas en el Atlas del Cambio climático en Asturias (Taboada y Anadón, 2010), la precipitación anual acumulada del emplazamiento es de 1.082,8 mm año⁻¹ y la temperatura media anual de 13,3 °C.

El primer trabajo realizado para determinar la contaminación en la zona fue en el año 2000 y se enmarca dentro del convenio de colaboración entre el Instituto de Crédito Oficial (ICO) y la empresa para la Gestión de Residuos Industriales S.A. (EMGRISA) en materia de suelos contaminados por residuos de origen industrial. Este trabajo se realizó en el contexto de la Ley de Residuos 10/1998, de 21 de abril, que en su artículo 27, obliga a incluir en el Registro de la Propiedad una nota que refleje la declaración de un suelo como contaminado y declara responsable al propietario cuya actividad industrial ha generado dicha contaminación.

En el año 2009 el Servicio de Gestión Ambiental de la Dirección General del Agua y Calidad Ambiental (Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias) como promotor, por medio de la Sociedad de Servicios del Principado de Asturias (SERPA, S.A.), encarga a DEC (Deme Environmental Contractors NV) las obras de instalación de una red piezométrica y la realización de ensayos de tratamiento de suelos para conocer el nivel de contaminación del emplazamiento. Dentro de este trabajo se realizaron sondeos, calcatas y análisis de puntos de agua para determinar el nivel de contaminación. La figura 2.7. muestra la ubicación de las calcatas y sondeos que se realizaron fuera de los edificios y donde se llevo a cabo una medición de metales de los

Horizontes A, B o Bbis (Tabla 2.1.) mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Tabla 2.1.: Resultados de las muestras (mg Kg^{-1}) de los sondeos y calicatas realizados en por la Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias en 2009.

Muestra	Cu	As	Cd	Hg	Pb	Zn
Sondeos						
S-03 Horizonte B	82	18	<0,4	0,89	88	180
S-06 Horizonte B	980	300	7,3	5,6	1700	2600
S-10 Horizonte B	1100	230	4,3	20	2400	2200
S-10 Horizonte Bbis	1600	110	17	8,3	830	3500
S-13 Horizonte B	110	52	2,4	0,74	560	410
S-15 Horizonte B	62	39	<0,4	0,65	33	89
S-18 Horizonte B	24	13	<0,4	0,83	<10	28
Calicatas						
C09-012 Horizonte B	8500	290	13	9,1	6200	8000
C09-026 Horizonte B	480	52	4	0,34	420	1300
C09-026 Horizonte Bbis	2900	190	15	2,1	4100	7100
C09-034 Horizonte B	1700	210	12	2,5	2500	5300
C09-034 Horizonte Bbis	<5	140	24	4,2	5700	11000
C09-042 Horizonte B	42	48	-	1,6	110	43
C09-050 Horizonte B	170	56	<0,4	0,95	270	150
C09-055 Horizonte A	1800	400	6,6	4,6	6000	4500
C09-055 Horizonte B	99	38	0,41	0,15	160	120
C09-061 Horizonte B	64	22	<0,4	0,36	130	270
C09-072 Horizonte B	900	51	1,1	0,16	34	350
C09-081 Horizonte B	260	57	2,8	4	530	960
C09-084 Horizonte B	170	260	1,6	54	4000	2100
C09-085 Horizonte B	47	24	0,51	0,64	90	160
C09-088 Horizonte A	780	64	6,4	2,6	500	2100
C09-088 Horizonte B	100	33	1,4	4,4	200	410
C09-M02 Horizonte B	360	1200	3,2	7	4800	1300
C09-T10 Horizonte B	490	190	1,2	1,9	420	410
CF-S Muestra superficial	27	20	<0,4	0,86	31	86

Con estos datos se decidió realizar un análisis pormenorizado de una parcela de 60 x 30 m, ubicada entre S-10 y C09-M02. Se seleccionó este emplazamiento por estar constituido por una primera capa tierra vegetal donde comenzaba a desarrollarse vegetación, seguida por rellenos rojizos granates, probablemente material acumulado de la fosa previamente excavada en la zona de la antigua planta de ácido sulfúrico (Fig.2.8.).



Fig.2.8.: Muestra obtenida en la parcela donde se pueden ver la primera capa de tierra vegetal seguida de los residuos granates.

Esta parcela fue dividida en subparcelas de 10x10 m donde se tomaron muestras de las esquinas y del centro de cada subparcela. Las muestras se mezclaron, tamizaron y posteriormente se midió su contenido en metales pesados mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X por energía dispersa (XRF) por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 2.2. Asimismo se incluyen los NGR del Principado de Asturias establecidos para metales pesados en Suelos (Resolución de 20 de marzo de 2014) excepto para el caso del cromo (Cr) que se utiliza a los NGR del País Vasco (Ley 1/2005, de 4 de febrero, para la prevención y corrección de la contaminación del suelo) por ser la única legislación en la que se tiene en cuenta el contenido total de Cr, siendo en ambos casos el valor superior del rango el límite permitido para uso Industrial y el menor el permitido para otros usos.

Tabla 2.2.: Resultados de las muestras (mg Kg^{-1}) de las subparcelas de Nitrastur. NGR indica los Niveles Genéricos de Referencia para el Principado de Asturias. * Indica los NGR para el Cr total del País Vasco. Los valores que superan los NGR para uso industrial aparecen sombreados.

Muestra	Cr	Ni	Cu	As	Se	Cd	Sb	Hg	Pb	Zn
NGR	550-90*	6500-65	4000-55	200-40	2500-25	200-2	295-5	100-1	800-70	10000-455
A1	0	29	11	43	0	4	9	0	0	79
A2	3	46	1216	248	2	8	23	0	978	1402
A3	115	59	2019	275	3	20	16	3	1383	833
B1	86	51	3000	2056	0	53	215	506	7722	2756
B2	38	41	1242	681	8	22	52	32	2384	1943
B3	146	95	646	276	9	19	12	35	382	1213
C1	334	86	1153	804	9	29	73	4	2990	987
C2	0	40	248	96	0	6	9	0	226	292
C3	0	47	1008	2789	1	61	272	0	8146	1591
D1	123	63	1237	1572	5	39	93	6	2534	1595
D2	0	41	1547	3922	7	70	365	3	7197	1974
D3	0	32	3787	3307	3	107	444	28	12032	1984
E1	348	55	2485	1172	2	56	88	0	2303	6837
E2	175	68	1232	1939	11	27	150	104	2787	1592
E3	19	50	701	1088	5	6	103	3	1824	1348
F1	171	53	1729	1204	47	33	145	71	2630	2164
F2	90	32	596	666	7	7	57	12	876	737
F3	105	41	853	4125	24	20	370	37	3851	1205



Fig.2.7. Ortofotografía PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias) de Nitrastur, mostrando las instalaciones. Los puntos indican la ubicación de los sondeos y las calicatas.

2.2. El Terronal

El Terronal se encuentra situado al Norte de la localidad de Mieres, en una zona semiurbana (Fig.2.9.). Las escombreras de El terronal se sitúan en paralelo al arroyo San Tirso cerca de la confluencia con el río Caudal en Mieres, realizándose su acceso a través de la carretera AS-242. Urbanísticamente, según el Plan General de Ordenación Urbana (PGOU) de Mieres, los terrenos del emplazamiento están clasificados como Suelo No Urbanizable del tipo Núcleo Rural.

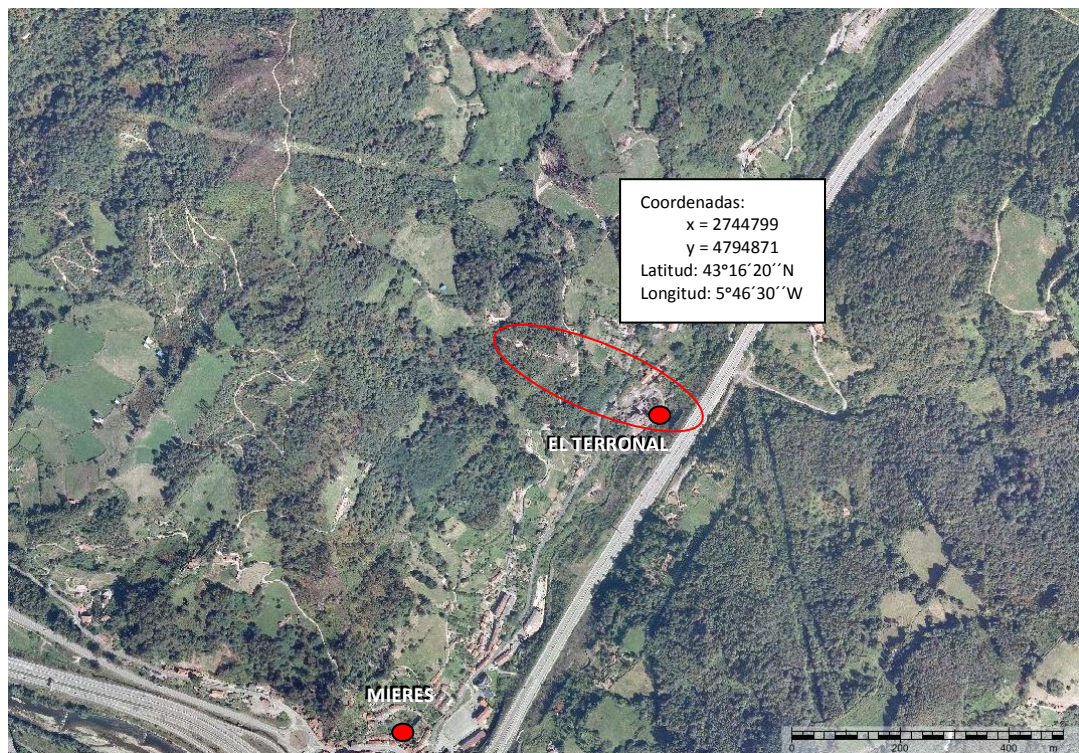


Fig.2.9.: Ortofoto general de la localización de El Terronal. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

El Terronal fue una de las minas de mercurio (Hg) más grandes en Asturias. El inicio de su explotación se remonta a la época de los romanos, cuya actividad se limitó a los niveles superiores de mineralización (Dory, 1894), pero no fue hasta los siglos XIX y XX cuando la minería de Hg comenzó a ser una próspera e importante industria (Gutiérrez-Claverol y Luque, 1993). En 1844 la Sociedad Minera la Fraternidad registró la concesión de la mina, siendo adquirida ésta en 1946 por la Sociedad El Porvenir, la cual trabajó en el emplazamiento durante 60 años. En 1907 la concesión pasa a manos de *The Oviedo Mercury Mines Ltd.* hasta 1911, cuando la concesión les fue embargada y concedida a la Sociedad Herrero y Cía, que continúa con su explotación hasta 1934, año en el que se paraliza la actividad. En 1960 Astur-Belga de Minas consigue la propiedad de la concesión comenzando una década de gran producción, llegando a ser en esta época la segunda mina de Hg más productiva en España y la octava más productiva del mundo (Loredó *et al.*, 1999). Finalmente la mina clausuró su actividad en 1974 como consecuencia de la bajada del precio internacional del Hg causada principalmente debido a la mayor conciencia pública con respecto a los riesgos para la salud y cuestiones ambientales (Gutiérrez-Claverol y Luque, 1994).

La extracción moderna se realizó mediante una mina subterránea (Fig.2.10.A) explotada en 12 niveles (Luque, 1985). El cinabrio (sulfuro de mercurio, HgS) extraído se trataba en el sitio en hornos de tostación a 580 °C aproximadamente (Fig.2.10.B), en el que se

oxidaba el mineral para producir SO_2 y vapor de Hg. Los gases de Hg pasaban a través de un sistema de condensadores para precipitar el Hg. Los gases residuales de este proceso derivaban a una larga chimenea cuyo trazado discurría ladera arriba de la montaña, en la que estaban situadas las instalaciones, para prevenir la contaminación de los trabajadores (Loredo *et al.*, 1999).



Fig.2.10.: A) Castillete de entrada a lamina, B) Tambor de calcinación y chimenea.

Al cierre de la explotación se extrajeron muchos frascos de los restos de Hg que impregnaban esta chimenea, lo que representó una pérdida del metal durante el procesamiento y una considerable fuente de contaminación para la zona. Además, como legado de esta actividad industrial, han quedado las instalaciones abandonadas (edificios de la mina, castillete, horno de tostación, chimenea,...) y una cantidad significativa de residuos mineros y metalúrgicos apilados en la superficie de la instalación (Fig.2.11.) y en las márgenes del Arroyo San Tirso, constituyendo la liberación y la dispersión de estos materiales a través aire y el drenaje una importante fuente de contaminación de Hg en la zona. No se realizó ninguna medida preventiva para evitar la lixiviación hasta 2002, cuando unas 300.000 toneladas de estos residuos de la margen izquierda del arroyo San Tirso (material granular de diferentes tamaños) fueron encapsulados (Fernández-Martínez *et al.*, 2006), para ser utilizados como relleno en la instalación de la fábrica de Thyssen (Gobierno del Principado de Asturias).



Fig.2.11.: A) Residuos apilados en el interior del emplazamiento, B) Abedules colonizando la base de una acumulo de residuos.

Geológicamente, las mineralizaciones de mercurio de esta zona están localizadas en el ámbito geológico de la Unidad de “La Justa-Aramil”, limitada por dos fracturas de dirección

noroste-sureste, en el borde noroccidental de la cuenca carbonífera central. Estas fallas son: la Falla Cabalgante de La Peña y la Falla de la Carrera (Luque, 1985). Los materiales presentes en la zona corresponden al Carbonífero Superior, de edad Westfaliense D (García-Loygorri *et al.*, 1971). Los sedimentos están constituidos por areniscas, conglomerados, lutitas, calcáreas y niveles de carbón de escaso espesor (Luque *et al.*, 1983).

Fitogeográficamente, de acuerdo con Díaz y Fernández (2007), el emplazamiento se enmarca en la misma región que Nitrastur. De igual manera, tanto bio como termoclimáticamente, siguiendo los criterios de Rivas-Martínez *et al.* (2004), la zona se ajusta al mismo piso bioclimático que Nitrastur. Según el Atlas del Cambio climático en Asturias (Taboada y Anadón, 2010), la precipitación anual acumulada del emplazamiento es de 1097,5 mm año⁻¹ y la temperatura media anual de 13,2 °C.

Este emplazamiento ha sido objeto de diferentes estudios (Loredo *et al.*, 1999; 2003a; Fernández-Martínez *et al.*, 2006; Gobierno del Principado, 2001), por lo que se conoce con detalle la acumulación media de metales del suelo. La Tabla 2.3. muestra la concentración de metales en los 25 cm superiores del suelo (Ordoñez *et al.*, 2013):

Tabla 2.3.: Concentración de metales en 89 muestras de suelo de El Terronal (Gobierno del Principado de Asturias 2001; Loredo *et al.*, 2003a ;2003b) analizados mediante ICP-MS. Resultados expresados en mg Kg⁻¹, excepto el Fe (%).

El Terronal (n=89)											
Metales	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Ni	Pb	Sb	Zn
Min.	6	0,1	1	6	5	0,8	2	2	8	1	11
Max.	9116	1	38	43	151	32	1585	65	187	27	472
Media	816	0,2	11	17	24	3,7	111	17	47	3	101
Dev. St.	1682	0,2	5,2	5	18	3,2	234	10	40	5	100

2.3. Olicio

El Pozo de Olicio se encuentra a unos 350 m de la aldea del mismo nombre (Fig.2.12.), perteneciente a la parroquia de Triongo, paralelo al arroyo Brengues cuyas aguas vierten al río Sella y situado a unos 5,7 Km al norte de la capital municipal Cangas de Onís. Su acceso se realiza mediante la carretera local CO-1. Urbanísticamente, según el PGOU de Cangas de Onís el suelo donde se sitúa el emplazamiento estaría clasificado como Suelo No Urbanizable de Interés Paisajístico. Se trata, comparativamente, del emplazamiento menos extenso de los 3 seleccionados.

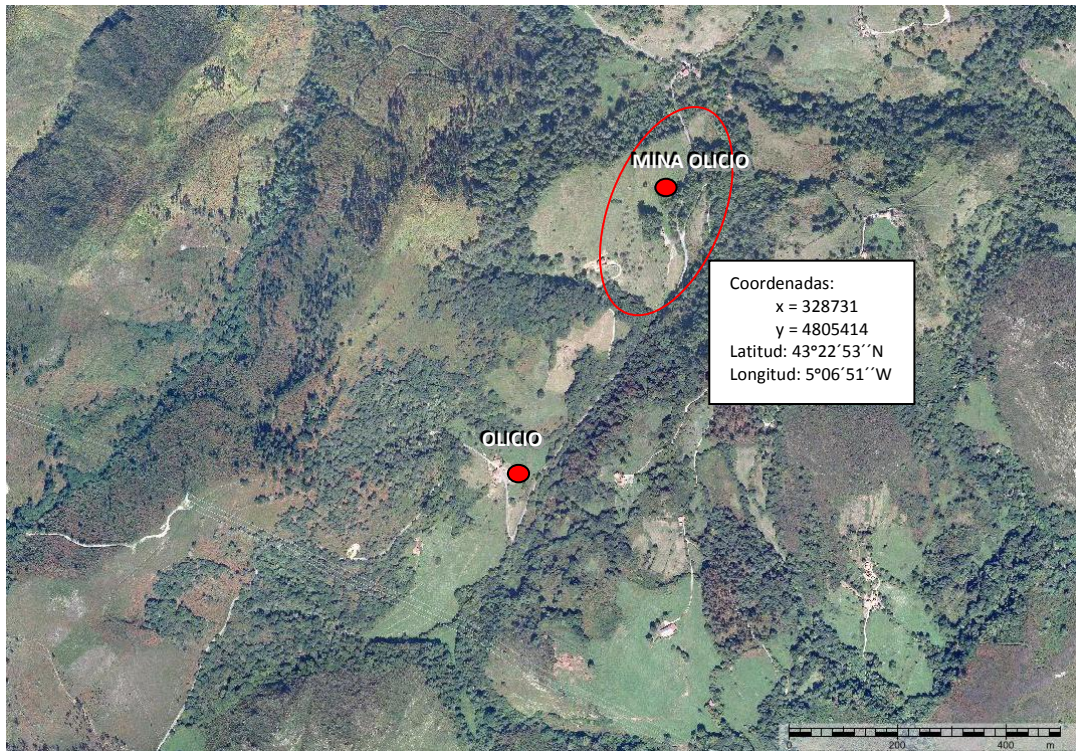


Fig.2.12.: Ortofoto general de la localización de Olicio. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

La mina de Olicio fue explotada por la compañía Rio Kumer S.A. que comienza su actividad en este emplazamiento en 1962 a raíz de la paralización del yacimiento Campa del Trave en las cercanías de San Tirso (Cangas de Onís). En 1965 se iniciaron las labores de extracción de cinabrio hasta 1973 mediante un pozo vertical (Fig.2.13.), 2 transversales y 6 niveles, llegando a una profundidad de 40 m (Ordoñez *et al.*, 2013). Existían además otras explotaciones menores en los alrededores pero toda la actividad metalúrgica se centralizó en este emplazamiento, llegando a tener una producción de 35 frascos al mes (Luque, 1985). El material extraído era tratado en el horno de mufla. Debido a su propia actividad, residuos mineros y cenizas metalúrgicas se fueron depositando en una escombrera situada aguas abajo unos 5 metros bajo del nivel del pozo a lo largo del arroyo Brengues. El volumen de los desechos apilados actualmente se estima en 9.000 m³, pero se sabe que una parte de los residuos se usó como capa de balasto para el desarrollo de caminos rurales en la zona (Gobierno del Principado de Asturias, 2001) (Ordoñez *et al.*, 2013). Actualmente el emplazamiento está dividido en parcelas pertenecientes a diferentes propietarios, y gran parte está siendo utilizado para el pastoreo de ganado vacuno.



Fig.2.13.: Antiguo castillete de la mina

La zona de estudio geológicamente está situada en la Zona Cantábrica (Lotzge, 1945) y corresponde a la Región del Manto de Ponga (Julivert, 1971). Está constituida por materiales cámbricos y ordovícicos sobre los que reposa directamente la serie carbonífera. En esta zona el Hg nativo y el cinabrio aparece principalmente en la Caliza de Montaña (Namuriense), que corresponde a una serie carbonatada constituida esencialmente por micritas (mudstone), con elevado contenido en materia orgánico-bituminosa. En menor medida este metal también se puede encontrar en vetillas milimétricas de cuarcitas del Ordovícico y/o en una arenisca fina del Devónico (Ordóñez *et al.*, 2013).

Fitogeográficamente, de acuerdo con Díaz y Fernández (2007), el emplazamiento se enmarca en la misma región que Nitrastur. Bioclimáticamente, de acuerdo con los criterios de Rivas-Martínez *et al.* (2004) la zona se ajusta al macroclima templado oceánico submediterráneo como los anteriores emplazamientos, sin embargo termoclimáticamente en este caso se ajusta al piso mesotemplado. Según el Atlas del Cambio climático en Asturias (Taboada y Anadón, 2010), la precipitación anual acumulada del emplazamiento es de 1.218 mm año⁻¹ y la temperatura media anual de 12,9 °C.

Este emplazamiento, al igual que El Terronal ha sido ampliamente estudiado (Luque, 1985; Gobierno del Principado, 2001; Ordóñez *et al.*, 2013) y de igual manera se dispone de los datos de la contaminación media de los 25 cm superiores de suelo de este emplazamiento (Tabla 2.4.).

Tabla 2.4.: Concentración de metales en 6 muestras de suelo de Olicio (Gobierno del Principado de Asturias, 2001; Ordóñez *et al.*, 2013) analizados mediante ICP-MS. Resultados expresados en mg Kg⁻¹, excepto el Fe (%).

Olicio (n=6)											
Metales	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Ni	Pb	Sb	Zn
Min.	36	<0,2	15	14	37	1,8	76	19	20	7,7	22
Max.	297	0	43	89	127	2	344	72	172	22	37
Media	177	0,3	29	27	84	2,1	152	50	64	15	27
Dev. St.	98	0,1	11,4	30	36	0,2	96	22	57	6	5

2.4. SIA Cooper S.A.-KME LOCSA

La Sociedad Industrial Asturiana Copper S.A. (SIA Copper S.A.) y la desaparecida Laminados Oviedo-Córdoba (LOCSA) se encuentran ubicadas en la margen de la autovía que une Posada de Llanera y la A-66 (Fig.2.14.), en la Avenida Conde Santa Bárbara en el municipio de Lugones perteneciente al Concejo de Siero, en lo que hoy es el polígono industrial SIA Copper. Según el PGOU del concejo de Siero, el emplazamiento tiene la calificación de Suelo Industrial.



Fig.2.14.: Ortofoto general de la localización del Polígono SIA Copper. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

En 1896 comienza a producir la denominada Fábrica de Metales en Lugones, perteneciente a La Sociedad Industrial Asturiana Santa Bárbara S.A. Su objetivo era la producción de metales, principalmente cobre, bronce y latón. Disponía de hornos de reverbero para el cobre bruto, tres salas de electrolisis, 100 hornos de crisol para preparar toda clase de aleaciones de cobre (Cu) y dos trenes de laminación, uno en frío y otro en caliente. Actualmente la empresa SIA Copper S.A. está en manos de otros propietarios y ha pasado a denominarse Asturcopper, y se dedica a la fabricación y venta de alambrón, hilos y alambre plano de cobre electrolítico, ocupando las instalaciones una superficie de 8.600 m². Situada al lado de esta fábrica se encontraba la LOCSA que inició sus actividades en 1978 como productor de aleaciones estándar y especiales de Cu y zinc (Zn), cerrando en 2004.

Consultado el MAGNA 1:50.000, y los datos del inventario de suelos contaminados del Gobierno del Principado de Asturias, la zona de estudio se encuentra situada en el área Terciaria de Asturias. El suelo está constituido por material de relleno del río Noreña, arenociloso que reposa sobre material Cuaternario fluvial (aluvial, derrubios).

Fitogeográficamente, de acuerdo con Díaz y Fernández (2007), el emplazamiento se enmarca en la misma región que Nitrastur y El Terronal. De igual manera, tanto bio como termoclimáticamente, siguiendo los criterios de Rivas-Martínez *et al.* (2004), la zona se ajusta al mismo piso bioclimático que estos dos emplazamientos. Según el Atlas del Cambio climático

en Asturias (Taboada y Anadón, 2010), la precipitación anual acumulada del emplazamiento es de 1.059,6 mm año⁻¹ y la temperatura media anual de 13,1 °C.

El emplazamiento fue inventariado por el Gobierno del Principado de Asturias en 1999 como parte de la Fase I del Inventario de Suelos potencialmente contaminados. Según recoge este informe, en la parcela se encuentran residuos de la termometalúrgica de Cu, lodos de procesos hidrometalúrgicos y aceites usados. Además indica que existe una charca con colores metálicos en superficie. Adicionalmente se recogieron 3 muestras de suelo de entre 0 y 40 cm de profundidad que se analizaron mediante ICP-MS y Absorción Atómica de Llama (Hg). Los datos medios de este análisis se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5.: Concentración de metales en 3 muestras de suelo de Polígono SIA Cooper (Gobierno del Principado de Asturias 2001) analizados mediante ICP-MS y Absorción Atómica de Llama (Hg). Resultados expresados en mg Kg⁻¹, excepto el Fe (%).

SIA Cooper-LOCSA (n=3)									
Metales	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn
Min.	20	<0,2	9	28	0,92	1	7	5	22
Max.	423	24	2083	28535	6,77	6	5161	1382	35467
Media	193,33	11,73	741	12011,33	3,35	2,67	1766,67	545,33	15091
Dev. St.	207,32	12,01	1163,8	14785,91	3,05	2,89	2940,24	734,77	18308,75

Entre Octubre y Noviembre de 2003 (Fernández *et al.*, 2008) se muestreó esta zona en busca de esporocarpos, recolectando varios ejemplares de *P. ammoniavirescens* bajo un ejemplar de *Betula celtiberica*. Esta especie posteriormente se aisló *in vitro* en cultivo puro y con ella fue con la que se iniciaron los trabajos de producción y optimización del crecimiento y micorrización. Lamentablemente no se pudieron realizar más muestreos en este emplazamiento, ya que al ser un polígono en construcción, a lo largo de los últimos años se ha eliminado vegetación, removido el suelo o se ha construido.

2.5. Bibliografía

- B.O.E. (1998). Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos.
- B.O.E. (2005). Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- B.O.E. (2011). Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- B.O.P.A. (2014). Resolución de 20 de marzo de 2014, de la Consejería de Fomento, ordenación del Territorio y Medio Ambiente, por la que se establecen los niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en suelos del Principado de Asturias.
- B.O.P.V. (2005). Ley 1/2005, de 4 de febrero, para la prevención y corrección de la contaminación del suelo.
- [Docomomo] (2013). Documentation and Conservation of buildings, sites and neighbourhoods of the Modern Movement. <http://www.docomomoiberico.com>.
- Dory, A. (1894). Le mercure dans les Asturies. *Rev Univ Mines Metall.* 32:145–210.
- Díaz, T.E. y Fernández, J. (2007). Biogeografía de Asturias: bases para su actualización. I Congreso de Estudios Asturianos. Tomo VI Comisión de Ciencias de la Naturaleza y Tecnología. pp. 33-53.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, R.S. (2008). Cadmiun accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environ Pollut.* 152:522-529.
- Fernández-Martínez, R., Loredó, J., Ordoñez, A., Rucandio, M.I. (2006). Physicochemical characterization and mercury speciation of particle-size soil fractions from an abandoned mining area in Mieres, Asturias (Spain). *Environ Pollut.* 142:217-226.
- García-Loygorri, A., Ortuño, G., Caride de Liñan, C., Gervilla, M., Greber, C., Feys, R. (1971). El Carbonífero de la Cuenca Central Asturiana. *Trabajos de Geología.* 3:101-151.
- Gobierno del Principado de Asturias; (2001). Consejería de Medio Ambiente. Inventario de y caracterización de suelos contaminados. Dirección General de Calidad Ambiental. Expediente AT/2000/58-97.
- Gobierno del Principado de Asturias; (2009). Dirección General de Calidad Ambiental. Proyecto de Ejecución de Obras de Instalación de Red Piezométrica y Realización de Ensayos de Tratamiento de Suelos en la Parcela situada en la Av. Pablo Picasso nº 73, La Felguera (Langreo), Asturias. Deme Environmental Contractors NV.
- Gutiérrez-Claverol, M. y Luque, C. (1994). Recursos del subsuelo de Asturias. Servicio de Publicaciones. Universidad de Oviedo, 2nd Ed. pp. 391.

- Julivert, M. 1971. Decollement tectonics in the Hercynian Cordillera of NW Spain. *Am J Sci.* 270:1-29.
- Loredo, J., Ordóñez, A., Gallego, J., Baldo, C., García-Iglesias, J. (1999). Geochemical characterisation of mercury mining spoil heaps in the area of Mieres Asturias, northern Spain. *J Geochem Explor.* 67:377-390.
- Loredo, J., Ordoñez, A., Baldo, C., García-Iglesias, J. (2003a). Arsenic mobilization from waste piles of the El Terronal mine, (Asturias, Spain). *Geochem Explor Env A.* 3:229-237.
- Loredo, J., Ordoñez, A., Charlesworth, S., De Miguel, E. (2003b). Influence of industry on the geochemical urban environment of Mieres (Spain) an associated health risk. *Environ Geochem Hlth.* 25:307-323.
- Lotze, F. (1945). Zur gliederung der varisziden der Iberischen Meseta. *Geotektonische Forschungen.* 6:78-92.
- Luque, C., Gervilla, M., Sáenz de Santa María, J.A., Leyva, F., Laveine, J.P., Loboziak, S., Martínez Chacón, M.L. (1983). Características sedimentológicas y paleontológicas de los paquetes productivos en el corte de la Inverniza-El Cabo (Cuenca Central Asturiana). *CR X Congr Int Strat Geol Carbonifere Madrid.* 1:281-303.
- Luque, C. (1985). Las mineralizaciones de mercurio de la Cordillera Cantábrica. Tesis doctoral. Univ. Oviedo. pp. 1531.
- [MAGNA] (2009) Mapa Geológico de España a escala 1:50.000. Instituto Geológico y Minero de España. <http://www.igme.es/internet/cartografia/cartografia/magna50.asp>.
- Rivas-Martínez, S., Penas, A., Díaz, T.E. (15 Julio 2004). Servicio Cartográfico, Universidad de León. <http://www.globalbioclimatics.org>.
- Ordoñez, A., Álvarez, R., Loredo, J. (2013). Asturian mercury mining district (Spain) and the environment: a review. *Environ Sci Pollut Res.* 20:7490-7508.
- Taboada, F. y Anadón, R. (2010). Atlas del cambio Climático en Asturias. Depto. de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo en colaboración con la Oficina para la Sostenibilidad, el Cambio Climático y la Participación del Principado de Asturias. <http://idebos.bio.uniovi.es/GeoPortal/Atlas/>.



CAPÍTULO 3

HONGOS MACROMYCETES EN ZONAS DEGRADADAS Y ACUMULACIÓN DE METALES PESADOS

3.1. Introducción

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la capacidad acumuladora de metales pesados por parte de los cuerpos fructíferos de diferentes especies de hongos Macromycetes, tanto micorrícicos como saprófitos (García *et al.*, 2009; Michelot *et al.*, 1998; Kalač 2010). Esta capacidad es conocida como bioabsorción y ha sido definida por Shumate y Strandberg (1985) como una serie de mecanismos físico-químicos no dirigidos que pueden ocurrir entre las distintas especies de metales y los componentes celulares de diferentes especies biológicas. La captación biológica por parte de los hongos se puede dividir en 3 categorías (Danesh *et al.*, 2013): (1) Captura por unión a sitios específicos presentes en la estructura celular, (2) captación intracelular y (3) transformación química. Las dos últimas se realizan por células vivas e involucran una captación activa por parte de las mismas, por lo que se podría denominar como bioacumulación (Kapoor *et al.*, 1999).

Esta captación de metales abre la puerta a la posible utilización de diferentes especies fúngicas en lo que se ha llamado programas de y fitorremediación.

En Asturias existen numerosas zonas con suelos pobres, degradados o contaminados debido a actividades mineras e industriales. El suelo de estas zonas suele contener metales pesados como arsénico (As), mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb) y antimonio (Sb), que hace difícil e incluso imposible su recuperación forestal cuando se realizan técnicas convencionales. Por problemas de impacto ambiental y al amparo de los planes regionales de reforestación, sería necesario revegetar para integrar las zonas alteradas en el paisaje natural.

Desde hace años ha quedado establecida la dependencia que tienen los árboles de los hongos micorrícicos sobre todo cuando las características edáficas son adversas. Numerosos trabajos están demostrando que si se revegetan zonas degradadas con árboles micorrizados se consiguen tasas de supervivencia y desarrollo muy superiores a las alcanzadas con árboles sin micorrizar (Duñabeitia *et al.*, 2004; Merharg y Cairney, 2000). Más aun, Adriaensen *et al.* (2006) afirman que las ectomicorrizas mejoran la resistencia de algunas especies a los metales pesados. Sin embargo, el efecto de las asociaciones micorrícicas en la absorción de los metales pesados por las plantas aún no está claro y parece ser específico de la planta, del hongo, del pH de la rizosfera, del metal específico y de la concentración de éste en el suelo (Jentschke y Godbold, 2000).

Por tanto, el éxito de la aplicación de la investigación ectomicorrícica en programas de recuperación de zonas contaminadas, dependerá de la disponibilidad de hongos seleccionados capaces de incrementar la tolerancia o la capacidad acumuladora de las plantas. Para realizar esta selección, es preciso hacer en primer lugar un estudio detallado de la comunidad fúngica presente en estas áreas contaminadas y determinar qué especies están adaptadas a las particulares condiciones edafo-climáticas de las zonas a recuperar.

Por otro lado, la recolección de Macromycetes silvestres para su consumo, hace necesario conocer la capacidad de acumulación de los cuerpos fructíferos, las partes del mismo que más concentración poseen y sus niveles de toxicidad. Kalač y Svodoba (2000) señalan que el transporte del metal del micelio al cuerpo fructífero se da al inicio de la fructificación, por lo que carpóforos juveniles serían más tóxicos (al estar el metal más concentrado). Asimismo también sugieren que los niveles máximos se dan en el esporóforo (pero no en las esporas), disminuyendo en el píleo y más aún en el estipe.

Por todo ello, el objetivo de esta parte del trabajo es recolectar e identificar las hongos Macromycetes, tanto saprófitas o micorrícicos, presentes en zonas contaminadas, determinando su capacidad acumuladora de metales pesados, así como sus niveles de toxicidad, con el fin de buscar candidatos para ser utilizados en programas de fito o micorremediación.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Muestreo de especies

Los muestreos se realizaron periódicamente durante los años 2011, 2012 y 2013 en Nitrastur (La Felguera), 2011 y 2012 en El Terronal (Mieres), y en 2012 en Olicio (Cangas de Onís), entre los meses de Octubre y Diciembre. Se recolectaron los ejemplares presentes de todas las zonas accesibles, determinando su ubicación mediante el Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (UTM) utilizando el Sistema de Referencia Terrestre Europeo 1989 (ETRS89). Los cuerpos fructíferos fueron recogidos en compartimentos independientes anotando ubicación y especie para su posterior traslado a laboratorio. En el caso de las especies ectomicorrícicas se determinaron las especies leñosas a las que pudieran estar asociadas. Una vez en el laboratorio los cuerpos fructíferos se limpiaron y se mantuvieron a 4 °C hasta su posterior determinación, aislamiento (Capítulo 6), recogida de muestras para extracción de ADN (Capítulo 5) y análisis de metales pesados. La elaboración de los mapas fue realizada utilizando la cartografía y ortofotos PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

3.2.2. Determinación taxonómica

Una vez limpios, los esporocarpos fueron fotografiados con una cámara digital Sony modelo Cyber-shot Digital Camera H20/B, fueron medidos y se realizó un raspado de las láminas o poros para la observación de las esporas. Para ello, se utilizó un microscopio Nikon modelo Eclipse E600W equipado con contraste de fase. Las esporas se montaban sobre un portaobjetos con una gota de lactoglicerol (ácido láctico, glicerina y agua (1-1-1)). Para realizar una correcta determinación taxonómica, se elaboraron unas fichas de identificación (Apéndice 1) basadas en la metodología utilizada por Andrés *et al.* (1992), Lodge *et al.* (2004) y Brundrett *et al.* (1996). Adicionalmente se secaron ejemplares de las diferentes especies en estufa de aire forzado a 50 °C durante 48 horas, para posteriormente introducir las en botes de cristal con silicagel para su conservación en herbario.

3.2.3. Análisis de metales pesados

Para conocer la capacidad acumuladora de todas aquellas especies de las que se logro encontrar cantidades suficientes, los esporocarpos se lavaron con agua corriente para eliminar la tierra, se eliminó la parte basal del pie y finalmente se lavaron las muestras 3 veces con agua destilada. En las especies de gran porte, o de las que se disponía de numerosos carpóforos, se separaron los tejidos internos de los externos (láminas-poros y cutículas del estipe y píleo). El resto de especies se trocearon y secaron en estufa de aire forzado. En el caso de las muestras recogidas en Nitrastur, la mitad de los ejemplares fueron secados a 70 °C durante 48 horas y la otra mitad a 35 °C durante 48-72 horas, siendo esta temperatura la escogida para el secado de las especies de El Terronal y Olicio para evitar la volatilización del posible mercurio (Hg) presente en las muestras. Una vez secos se trituraron en mortero con ayuda de Nitrógeno (N) líquido hasta ser pulverizados.

En primer lugar se realizó un análisis de la composición elemental mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X por energía dispersa (XRF), mediante un analizador modelo XMET 5100 X-Ray Fluorescence de Oxford Instruments. Es una técnica rápida y no destructiva, que se basa en aplicar sobre la muestra una radiación X incidente o primaria, lo que causa la emisión secundaria o fluorescente de radiación X por parte de los átomos que componen la muestra. Esto es debido a que la radiación X incidente expulsa electrones de las capas interiores del átomo, por lo que para volver a su estado de mínima energía los electrones de las capas externas ocupan los lugares vacantes. Este proceso se produce sucesivamente hasta que un electrón libre ocupa la última vacante del electrón de valencia. El exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones y al conjunto de fotones generados en este proceso se denomina serie espectral. Debido al hecho de que los estados de energía de los electrones atómicos están cuantizados y son característicos de cada elemento, los fotones de rayos X emitidos son, a su vez, característicos de los átomos que los generan. De este modo, tanto las energías como la probabilidad de que cada una de ellas se produzca, identifican de forma unívoca un elemento de otro. La concentración de cada elemento se detecta midiendo la intensidad de la energía asociada a cada transición de electrones. Es decir, la salida de un análisis XRF es un espectro que muestra la intensidad de radiación en función de la energía (Beckhoff *et al.* 2006).

Al no disponer de grandes cantidades de material, se introdujeron las muestras en bolsas de plástico estériles compactándolas en la base hasta conseguir un mínimo de 1 cm de grosor, lo que se estimó en 1,5 g de peso como cantidad mínima muestra necesaria. Debido a este factor limitante, en las especies que se habían dividido en tejidos internos y externos, si una de las dos fracciones no superaba los 1,5 g, se realiza una primera medición de la parte que alcanza el peso mínimo y posteriormente se mezclan ambas fracciones generando una nueva muestra para una segunda medición. En cada muestra en total se realizaron 3 mediciones. Adicionalmente se utilizó como control de las mediciones una muestra de *Paxillus involutus* recogido en terrenos no contaminados. Los metales medidos fueron Cromo (Cr), Níquel (Ni), Sb, Cu, As, Selenio (Se), Cd, Pb, Zn y Hg.

Tras los resultados obtenidos mediante XRF y para comprobar su fiabilidad, se seleccionaron 5 muestras, más la muestra control y se analizó su contenido en metales mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Siguiendo el protocolo establecido por Montaser 1998, las muestras (0,01 g) se sometieron a una digestión ácida con 3 ml de HNO₃ concentrado y altamente purificado. Posteriormente se atacaron en horno microondas, en un programa de 240 W durante 6 min, hasta conseguir el licuado total de las muestras. Una vez finalizado el ataque, y tras dejar enfriar las muestras, se realizaron dos diluciones sucesivas con agua desionizada (Milli-Q), una primera 1:20 y una segunda 1:10 a la que se añadieron 10 µg de Rodio (Rh) kg⁻¹ de HNO₃ concentrado como estándar interno. La muestra líquida se pasó a viales que se colocaron en el inyector automático para ser posteriormente introducida en ICP-MS tipo cuádruplo (HP- 7500c). En este equipo, la muestra se pasa por nebulización a través del canal central de plasma, generalmente de Argón, que se encuentra altamente ionizado. Los iones formados son extraídos del canal central por un cono de extracción y separados en función de su relación masa/carga llegando a un detector donde generan un pulso eléctrico que se filtra, modula y se cuantifica. Cada muestra se analizó por duplicado. Los metales medidos fueron hierro (Fe), manganeso (Mn), Cu, As, Se, Cd, Pb, Zn y Hg.

Mediante XRF se observó diferencias en el contenido de metales de una misma especie secada a diferentes temperaturas. Para corroborarlo, se analizó mediante ICP-MS, 3 muestras, por duplicado, de *P. cuprinus* secadas a 35 y 70 °C. Y de igual manera, para descartar

si las diferencias observadas eran debidas al origen de la muestra y no a la temperatura, a partir de la muestra de *P. cuprinus* previamente secada a 35 °C, se dividió a la mitad rehidratando ambas partes con dH₂O, y secando una mitad 48 horas a 35 °C y la otra 48 horas a 70 °C.

Para determinar si las especies fúngicas analizadas pueden considerarse acumuladoras, los resultados obtenidos se comparan con los niveles usuales de metales (Kalač 2010) encontrados en esporocarpos de zonas no contaminadas en Europa.

3.2.4. Tratamiento estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0. Para determinar si existen diferencias significativas en el contenido de metales de una misma especie con temperaturas de secado diferentes (35 °-70 °C), y entre la parte externa y el total o parte interna del carpóforo, se ha realizado la Prueba T de Student para muestras apareadas. Para comprobar la disimilaridad entre los datos observados entre ICP-MS y XRF se ha utilizado el método de Distancia euclídea. Los valores más altos indican que los elementos son muy distintos o que se encuentran muy alejados. Para determinar la relación existente entre los datos se ha utilizado el coeficiente de correlación Pearson y el coeficiente de determinación corregido. Asimismo se calculó la ecuación de la pendiente de regresión.

3.3. Resultados

3.3.1. Muestreo de especies

Tras los muestreos realizados, se han encontrado en total en los tres emplazamientos 27 especies diferentes de hongos Macromycetes, siendo 21 de ellas especies ectomicorrícicas y 6 saprófitas. Nitrastur fue el emplazamiento principal de este trabajo y en donde se realizó el muestreo más completo. Las recolecciones llevadas a cabo en los emplazamientos de El Terronal y Olicio se realizaron para intentar aumentar el inventario de setas encontradas en este tipo de zonas alteradas.

3.3.1.1. Nitrastur

Con el fin de simplificar su localización y puesto que muchas especies se encuentran ocupando el mismo área, se ha dividido el emplazamiento en 14 zonas, mostrando en la Tabla 3.1. las coordenadas UTM y sexagesimales del punto central de cada área.

Tabla 3.1.: Coordenadas referidas al sistema ETRS89 de las zonas de recolección en Nitrastur.

ZONAS	HUSO	UTM	LATITUD	LONGITUD
1	30	x = 281102,93 y = 4799129,07	43°18'47,34''N	5°41'57,36''W
2	30	x = 281033,64 y = 4799033,45	43°18'44,17''N	5°42'0,30''W
3	30	x = 281004,75 y = 4799055,65	43°18'44,86''N	5°42'1,61''W
4	30	x = 281023,92 y = 4799056,12	43°18'44,90''N	5°42'0,76''W
5	30	x = 280985,72 y = 4799086,75	43°18'45,85''N	5°42'2,50''W
6	30	x = 280903,09 y = 4799211,37	43°18'49,80''N	5°42'6,34''W
7	30	x = 280914,96 y = 4799221,62	43°18'50,14''N	5°42'5,83''W
8	30	x = 280909,82 y = 4799244,56	43°18'50,88''N	5°42'6,09''W
9	30	x = 280921,44 y = 4799320,89	43°18'53,36''N	5°42'5,68''W
10	30	x = 280961,62 y = 4794311,13	43°18'53,09''N	5°42'3,89''W
11	30	x = 280805,87 y = 4799288,94	43°18'52,21''N	5°42'10,76''W
12	30	x = 280723,25 y = 4799312,99	43°18'52,90''N	5°42'14,46''W
13	30	x = 280695,71 y = 4799316,27	43°18'52,98''N	5°42'15,69''W
14	30	x = 280847,11 y = 4799251,26	43°18'51,03''N	5°42'8,88''W

En el caso de Nitrastur se han encontrado 19 especies cuya distribución se muestra en la figura 3.1., 18 de ellas ectomicorrícicas y tan solo 1 saprófita. Las especies encontradas han sido:

Fig.3.1.: Ortofotografía de Nitrastur. Los números muestran las diferentes áreas de muestreo. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).



***Amanita muscaria* (L.) Lam.**

Localización: Zona 4, 6 y 7.

Posible especie hospedadora: *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *Cortinarius hemitrichus*, *Cortinarius* sp., *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma sinapizans*, *Inocybe dulcamara*, *Laccaria laccata*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *Paxillus ammoniavirescens*, *Russula versicolor*, *Scleroderma citrinum*, *Tricholoma cingulatum* y *Tricholoma fulvum*.

Píleo: De color rojo con restos de volva, presenta un diámetro de 10-11 cm, superficie seca y verrugosa, convexo (Fig.3.2.B). Margen incurvado en sección y liso en vista lateral. Láminas de color blanco, dispuestas regularmente. Libres, presentan el margen erosionado y el mismo color en toda la lámina, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm.

Estipe: Central, seco, liso, sólido y de color blanco (Fig.3.2.A). Con anillo membranoso de borde sencillo y base bulbosa con volva escamosa. Longitud de 9-11 cm y ancho de 2-3 cm. Color interno blanco.

Esporas: Globosas amigdaliformes (Fig.3.2.C), con ornamentación puntiforme o verrugosa. Longitud 10-13 μm , ancho 7-9 μm .



Fig.3.2.: A) *Amanita muscaria*, B) Setas junto a abedules en el área de muestreo, C) Esporas.

***Cortinarius alboviolaceus* (Pers.) Fr.**

Localización: Zona 11

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *Lepista flaccida* y *T. fulvum*.

Píleo: De color morado violeta, presenta un diámetro de 3-5 cm, superficie seca y lisa, ampliamente convexo (Fig.3.3.B). Margen decurvado en sección y liso en vista lateral. Láminas de color lila dispuestas regularmente. Libres, presentan el margen plano y el mismo color en toda la lámina, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm.

Estipe: Central, seco, liso, igual, sólido y del mismo color del píleo (Fig.3.3.A). Longitud de 4-5 cm y ancho de 0,6-0,8 cm. Color interno morado.

Esporas: Amigdaliformes y verrugosas (Fig.3.3.C). Longitud 8-12 μm , ancho 6-7 μm .

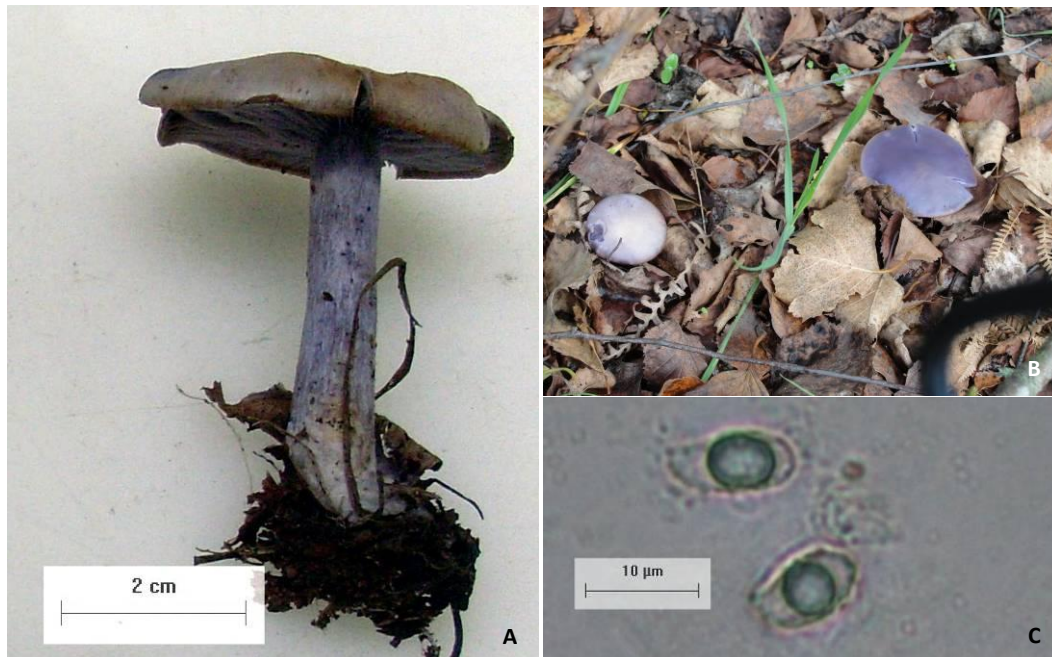


Fig.3.3.: A) *Cortinarius alboviolaceus*, B) Setas entre hojarasca de abedul, C) Esporas.

***Cortinarius hemitrichus* (Pers.) Fr.**

Localización: Zona 4.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *Cortinarius* sp., *H. sinapizans* y *R. versicolor*.

Píleo: De color marrón parduzco, presenta un diámetro de 1,8-2,1 cm, superficie seca, aterciopelada y convexa (Fig.3.4.A). Margen apendiculado en sección y liso tendiendo a rimoso en vista lateral. Láminas de color crema amarronado dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Decurrentes, presentan el margen plano y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual y de color blanco amarronado. Presenta restos de cortina. Longitud de 3-3,5 cm y ancho de 0,3-0,5 cm.

Esporas: Amigdaliformes tendiendo reniformes con ornamentación verrucosa (Fig.3.4.B.). Longitud de 7-8 μm , ancho 4-5,5 μm .



Fig.3.4.: A) Ejemplares de *Cortinarius hemitrichus* entre hojarasca de abedul. Fotografía de Santiago Serrano B) Esporas.

***Cortinarius* sp.**

Localización: Zona 4.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *C. hemitrichus*, *H. sinapizans* y *R. versicolor*.

Píleo: De color marrón chocolate con el borde más claro, presenta un diámetro de 2-3 cm, superficie seca y radialmente fibriloso, cónico en juvenil siendo plano papilado o mamilonado papilado en adulto (Fig.3.5.). Margen plano en sección y rimoso en vista lateral. Láminas de color marrón dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres, presentan el margen erosinado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso tendiendo a fibriloso, igual, con la base del estipe formando una almohadilla de micelio y de color blanco amarronado. Longitud 2,5-5,5 cm y ancho 0,3-0,5 cm.



Fig.3.5.: Ejemplares de *Cortinarius* sp junto a hojarasca de abedul y sauce. Fotografía de Juan Rodríguez.

***Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Qué.**

Localización: Zona 5.

Posible especie hospedadora: *S. caprea* y *Populus nigra*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *H. mesophaeum* e *I. dulcamara*.

Píleo: De color blanco amarillento, presenta un diámetro de 3-4 cm, superficie seca y lisa, convexo o infundibuliforme (Fig.3.6.A). Margen decurvado en sección y liso en vista lateral. Láminas de color amarillento dispuestas regularmente, poco densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres, presentan el margen erosionado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual, con la base del estipe formando una almohadilla de micelio y del mismo color del píleo. Longitud de 6 cm y ancho de 0,3-0,5 cm. Color interno blanco.

Esporas: Reniformes con ornamentación puntiforme (Fig.3.6.B). Longitud 10-11 μm , ancho 5-6 μm .



Fig.3.6.: A) *Hebeloma crustuliniforme*, B) Esporas.

***Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél.**

Localización: Zona 2, 5, 6 y 9.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinnerea*, *S. caprea* y *P. nigra*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *Hebeloma crustuliniforme*, *H. sinapizans*, *I. dulcamara*, *L. laccata*, *L. pubescens*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor* y *T. cingulatum*.

Píleo: De color crema parduzco, con cierto olor a chocolate, presenta un diámetro de 1,5-4,2 cm, superficie seca, lisa, convexo en juvenil y ampliamente convexo en adulto (Fig.3.7.A). Margen plano en sección y liso en vista lateral. Láminas de color crema amarillento dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres, presentan el margen ondulado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual y de color blanco en la zona de inserción con el píleo oscureciéndose hasta tomar su misma coloración. Longitud de 3,5-7 cm y ancho de 0,2-0,5 cm.

Esporas: Amigdaliformes con ornamentación verrucosa (Fig.3.7.B). Longitud 8-10 μm , ancho 5-6 μm .

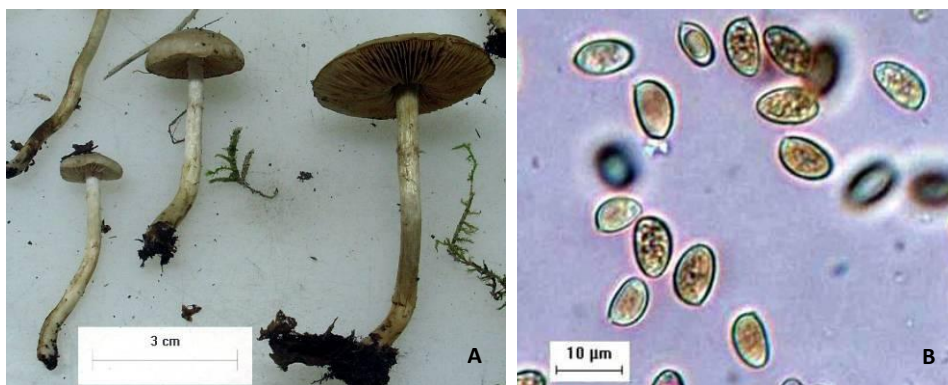


Fig.3.7.: A) *Hebeloma mesophaeum*, B) Esporas observadas en contraste de fase.

Hebeloma sinapizans (Paulet) Gillet

Localización: Zona 2, 3, 4 y 10.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocineria* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *C. hemitrichus*, *H. mesophaeum*, *I. dulcamara*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor* y *T. fulvum*.

Píleo: De color blanco ocráceo, presenta un diámetro de 2,5-3 cm, superficie seca y lisa, moderadamente deprimido (Fig.3.8.B). Margen decurvado en sección y con el margen enrollado en vista lateral. Láminas de color blanco dispuestas regularmente, poco densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres, presentan el margen erosionado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual, sólido, con la base formando una almohadilla de micelio y de color blanco amarronado (Fig.3.8.A). Longitud de 2,8-6,5 cm y ancho de 1,1-1,3 cm. Color interno blanco.

Esporas: Amigdaliformes y reniformes con ornamentación verrucosa (Fig.3.8.C). Longitud de 8-11 µm, ancho 4-6 µm.



Fig.3.8.: A) *Hebeloma sinapizans*, B) Setas entre hojarasca de abedul, C) Esporas.

***Inocybe dulcamara* (Pers.) P. Kumm.**

Localización: Zona 5, 6, 8 y 10.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocineria*, *S. caprea* y *P. nigra*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *Hebeloma crustuliniforme*, *H. mesophaeum*, *H. sinapizans*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* y *R. versicolor*.

Píleo: De color marrón anaranjado, presenta un diámetro de 4-5 cm, superficie seca y radialmente fibrilosa, desde ampliamente convexo, plano umbo aplanado hasta ligeramente deprimido (Fig.3.9.B). Margen plano en sección y estriado en vista lateral. Láminas de color blanco dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Angostas, presentan el margen ondulado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, sólido y del mismo color que el píleo. Base del estipe inserta (Fig.3.9.A). Longitud de 3-4 cm y ancho de 0,6-0,9 cm. Color interno marrón cremoso.

Esporas: Elipsoidales amigdaliformes, con ornamentación puntiforme o nodulada (Fig.3.9.C). Longitud de 8-11 μm , ancho 5-6 μm .



Fig.3.9.: A) *Inocybe dulcamara*, B) Setas junto a *Salix atrocineria*. Fotografía de Juan Rodríguez, C) Esporas.

***Laccaria laccata* (Scop.) Cooke**

Localización: Zona 6 y 13.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocineria* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *H. mesophaeum*, *L. pubescens*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor* y *T. cingulatum*.

Píleo: De color naranja ocre, presenta un diámetro de 3,5-5 cm, superficie seca y radialmente fibriloso, plano o ligeramente deprimido (Fig.3.10.B). Margen traslúcido estriado en vista lateral. Láminas de color rosa morado dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Adnadas, presentan el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual o claviforme, sólido y del mismo color del píleo (Fig.3.10.B). Longitud de 3-7 cm y ancho de 0,2-0,6 cm.

Esporas: Globosas y equinadas con un diámetro de 9-12 μm (Fig. 3.10.C).



Fig.3.10.: A) *Laccaria laccata*, B) Setas entre la vegetación herbácea, C) Esporas.

***Lactarius pubescens* Fr.**

Localización: Zona 3, 6, 7 y 9.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *H. mesopaheum*, *H. sinapizans*, *I. dulcamara*, *L. lacatta*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor*, *S. citrinum*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*.

Píleo: De color amarillo crema, presenta un diámetro de 9-10 cm, superficie seca y vellosa, infundibiliforme (Fig.3.11.B). Margen elevado en sección y elevado en vista lateral. Láminas de color blanco crema dispuestas regularmente, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Decurrentes, presentan el margen erosionado y el mismo color en toda la lámina

Estipe: Central, seco, liso, atenuado o igual, hueco y del mismo color del píleo (Fig.3.11.B). Longitud de 3-4 cm y ancho de 2 cm. Color interno rosado. Base del estipe cespitosa.

Esporas: Amigdaliformes o globosas con equinada con un diámetro de 5-7 µm (Fig.3.11.C).



Fig.3.11.: A) *Lactarius pubescens*, B) Setas de campo, C) Esporas.

***Leccinum scabrum* (Bull.) Gray**

Localización: Zona 2 (Fig.3.12.B) y 6.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *H. sinapizans*, *I. dulcamara*, *L. pubescens*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor* y *T. fulvum*.

Píleo: De color marrón, presenta un diámetro de 9-10 cm, superficie seca y lisa, convexo o ampliamente convexo (Fig.3.12.A). Margen decurvado en sección y liso en vista lateral. Poros angulares de color blanco amarillo de unión libre al estipe.

Estipe: Central, seco, entre reticulado y escamuloso, claviforme, sólido y de color blanco con escamas marrones. Longitud de 7,5-8 cm y ancho de 2-3 cm. Color interno blanco. Base del estipe formando una almohadilla de micelio.

Esporas: Fusiformes y lisas. Longitud 17-18 μm, ancho 5-6 μm (Fig.3.12.C).



Fig.3.12.: A) *Leccinum scabrum*, B) Setas junto a hojarasca de abedul y sauces, C) Esporas.

***Lepista flaccida* (Scop.) Pat.**

Localización: Zona 11.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Otras especies encontradas en la misma zona: *Cortinarius alboviolaceus* y *T. fulvum*.

Píleo: De color ocre, presenta un diámetro de 3-4 cm, superficie seca y lisa, umbilicado o fuertemente deprimido (Fig.3.13.A). Margen incurvado en sección y liso vista lateral. Láminas de color amarillo dispuestas regularmente, muy densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Arqueadas, presentan el margen plano y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, fibriloso, igual, sólido y de color crema. Longitud de 5-6 cm y ancho de 0,5-0,8 cm. Color interno blanco. Base del estipe formando una almohadilla de micelio.

Esporas: Globosas o subglobosas con ornamentación verrucosa o reticulada, con un diámetro de 3-5 μm (Fig.3.13.B).

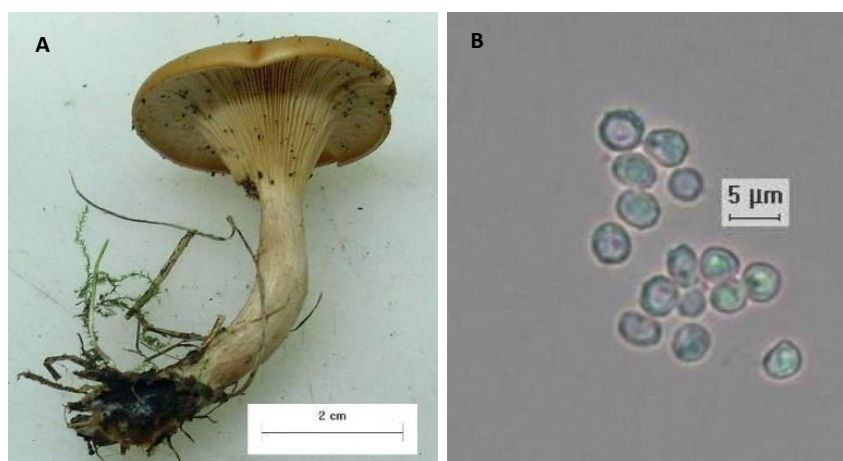


Fig.3.13.: A) Seta en laboratorio, B) Esporas.

***Paxillus ammoniavirescens* Contu & Dessì**

Localización: Zona 9.

Posible especie hospedadora: *B. celtibérica* y *S. atrocinnerea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *H. mesophaeum*, *L. pubescens*, *S. citrinum*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*.

Píleo: De color marrón crema, presenta un diámetro de 3-8,5 cm, superficie aceitosa y lisa, convexo tendiendo a umbonado (Fig.3.14.B). Margen decurvado en sección y con el margen enrollado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color blanco amarillentas y muy densas, con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Decurrentes, presentan el margen entre erosionado y crenado, y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, entre igual y atenuado, sólido y de color blanco ocre (Fig.3.14.A). Longitud de 2-4,5 cm y ancho de 0,5-2,5 cm. Color interno blanco amarronado. Base del estipe con almohadilla de micelio.

Esporas: Entre elipsoidales y amigdaliformes, lisas y oscuras. Longitud 7,2-8,8 μm , ancho 4,8-5,6 μm (Fig.3.14.C).

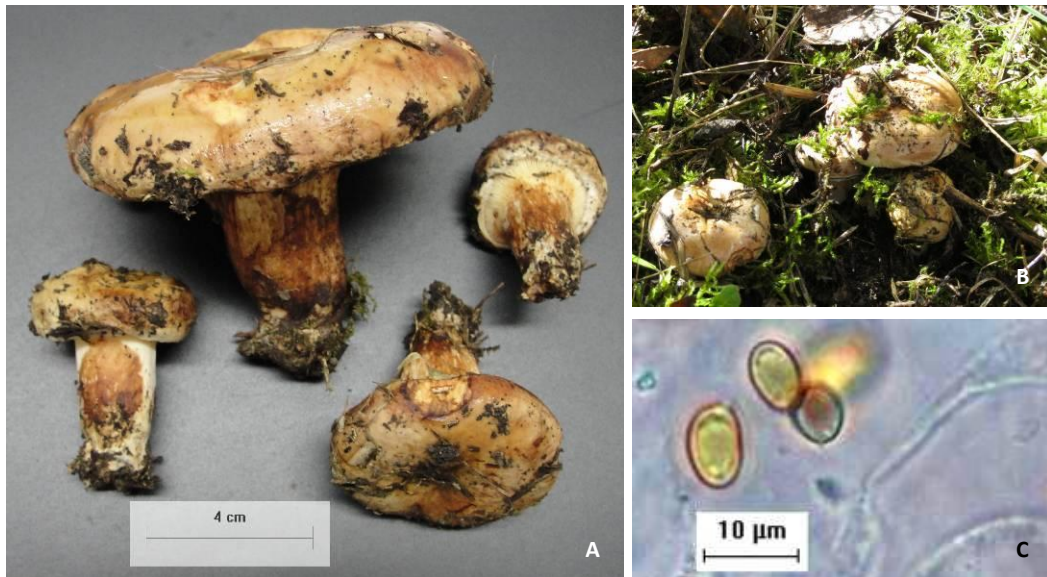


Fig.3.14.: A) *Paxillus ammoniavirescens*, B) Setas bajo abedul C) Esporas.

***Paxillus cuprinus* P. Jargeat, H. Gryta, J.P. Chaumeton & A. Vizzini**

Localización: Zona 6.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinnerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *H. mesopaheum*, *I. dulcamara*, *L. laccata*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *R. versicolor* y *T. cingulatum*.

Píleo: De color marrón anaranjado, presenta un diámetro de 4-6 cm, superficie pegajosa y lisa, deprimido o moderadamente deprimido (Fig.3.15.B). Margen convoluto en sección y con el margen enrollado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color blanco crema y densas. Decurrentes, presentan el margen ondulada y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual, sólido y de color blanco cremoso (Fig.3.15.A). Longitud de 1,2-2 cm y ancho de 0,8-1 cm. Color interno amarillo crema. Base del estipe cespitosa.

Esporas: Entre ovoides y amigdaliformes, lisas y oscuras. Longitud 8,5-9 μm, ancho 6-7 μm (Fig.3.15.C).

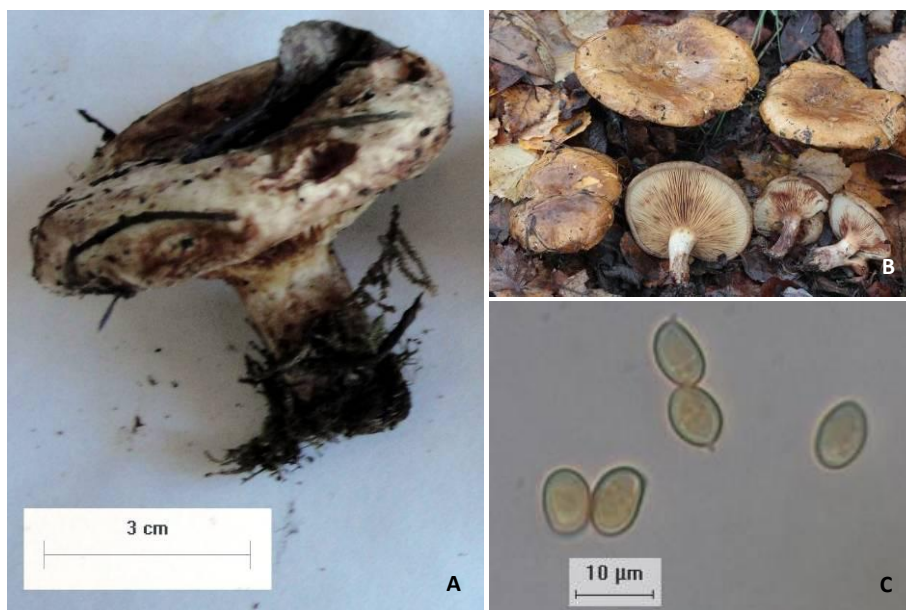


Fig.3.15.: A) *Paxillus cuprinus*, B) Setas de campo. Fotografía de Santiago Serrano, C) Esporas.

***Russula versicolor* Jul. Schäff.**

Localización: Zona 2, 4 y 6.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *C. hemitrichus*, *Cortinarius sp.*, *H. mesophaeum*, *H. sinapizans*, *I. dulcamara*, *L. laccata*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*.

Píleo: De color lila morado, presenta un diámetro de 2,5-5 cm, superficie viscosa y lisa, plano o deprimido (Fig.3.16.B). Margen elevado en sección y en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color blanco y poco densas, con un espacio entre ellas en el margen de 2 mm. Adnadas, con el margen erosionada y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual, sólido y de color blanco cremoso. Longitud de 1,5-7 cm y ancho de 0,9-1,5 cm. Color interno blanco (Fig.3.16.A).

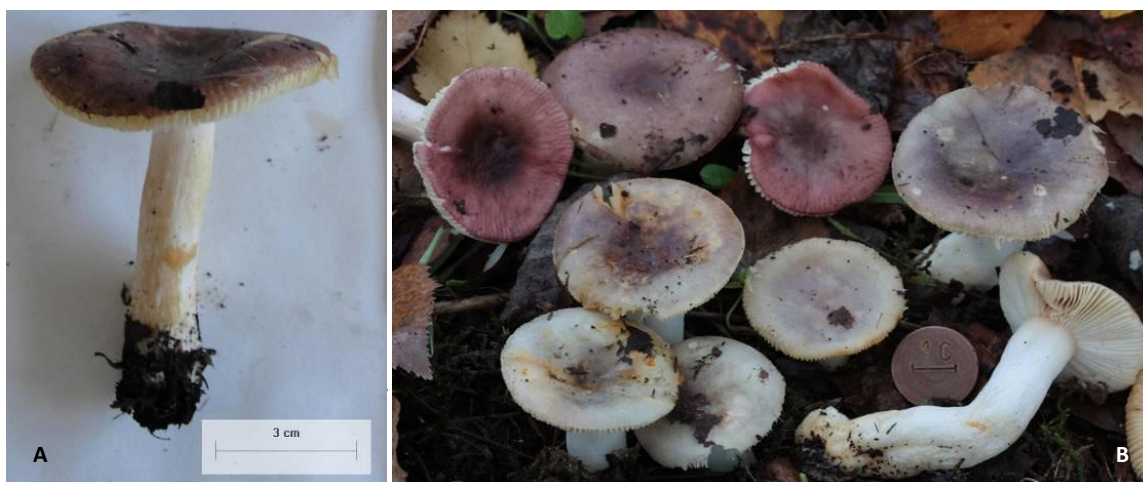


Fig.3.16.: A) *Russula versicolor*, B) Setas de campo. Fotografía de Juan Rodríguez.

***Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze**

Localización: Zona 1.

Posible especie hospedadora: *Pinus nigra*.

Otras especies encontradas en la misma zona: Ninguna.

Píleo: De color marrón cobrizo, presenta un diámetro de 6-12 cm, superficie húmeda y lisa, convexo tendiendo a plano (Fig.3.17.B). Margen plano en sección y traslúcido estriado vista lateral. Poros angulares de color amarillo con unión libre al estipe.

Estipe: Central, seco, entre reticulado y liso, igual tendiendo a claviforme, sólido y de color amarillento, ornamentado con granulaciones pardas (Fig.3.17.A). Longitud de 9-10 cm y ancho de 1-2 cm. Color interno amarillento.

Esporas: Fusiformes, lisas y oscuras (Fig.3.17.C). Longitud 9-12 μm , ancho 3-5 μm .

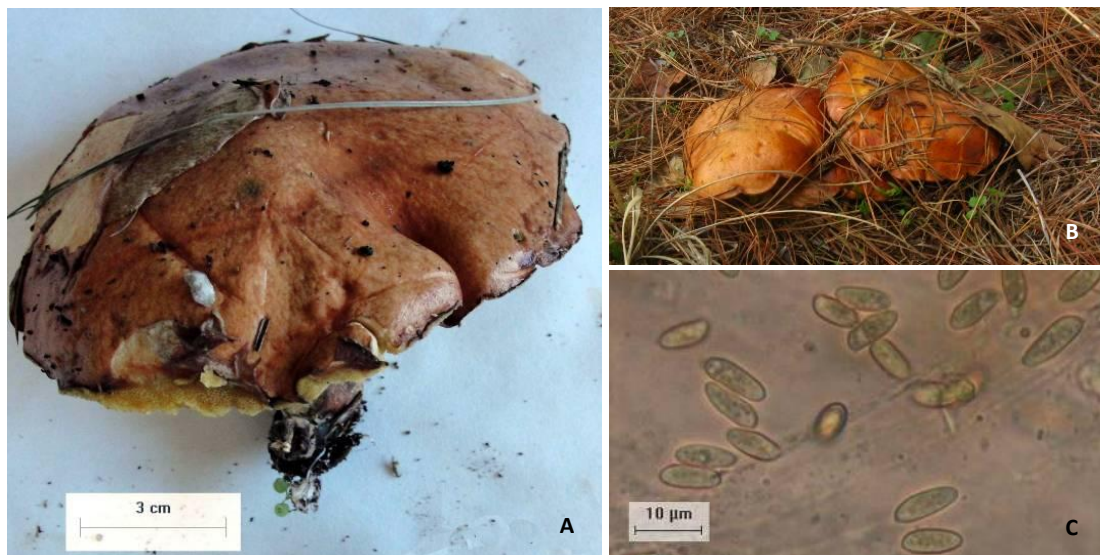


Fig.3.17.: A) *Suillus collinitus*, B) Setas cubiertas por las acículas del pino, C) Esporas.

***Scleroderma citrinum* Pers.**

Localización: Zona 7, 9 y 10.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *L. pubescens*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*.

Carpóforo: Globoso tendiendo a piriforme, de color ocráceo, superficie con escamas muy grandes, separadas e irregulares (Fig.3.18.B). Con pie muy bien desarrollado. Gleba negra pulverulenta (Fig.3.18.A).

Esporas: Globosas con ornamentación equinada y oscuras, con un tamaño entre 9-12 μm (Fig.3.18.C).



Fig.3.18.: A) *Scleroderma citrinum*, B) Seta campo, C) Espora observadas en contraste de fase.

***Tricholoma cingulatum* (Almfelt) Jacobashch**

Localización: Zona 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocineria* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *H. mesophaeum*, *L. laccata*, *L. pubescens*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor*, *S. citrinum* y *T. fulvum*.

Píleo: De color marrón grisáceo, presenta un diámetro de 2,5-4 cm, superficie seca, escamosa, ampliamente convexo en juvenil y fuertemente deprimido en adulto (Fig.3.19.B). Margen elevado en sección y enrollado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color blanco, densas, sinuadas, presentan el margen erosionada y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, liso, igual, sólido y de color blanco (Fig.3.19.A). Con anillo membranoso con borde sencillo. Longitud de 3,5-4 cm y ancho de 0,5-0,6 cm. Color interno blanco.

Esporas: Elipsoidales y lisas (Fig.3.19.C). Longitud 4-6 µm ancho 2,5-3,5 µm.



Fig.3.19.: A) *Tricholoma cingulatum*, B) Setas de campo. Fotografía de Juan Rodríguez, C) Esporas.

***Trichola fuvulm* (Fr.) Bigeard & H. Guill.**

Localización: Punto 2, 7,9 y 11.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. muscaria*, *C. alboviolaceus*, *H. sinapizans*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *L. flaccida*, *P. ammoniavirescens*, *R. versicolor*, *S. citrinum* y *T. cingulatum*.

Píleo: De marrón anaranjado, presenta un diámetro de 6-10 cm, superficie seca, entre lisa y agrietada, plano ligeramente umbonado o infundibuliforme (Fig.3.20.B). Margen elevado en sección y rimoso agrietado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color amarillo y densas, con un espacio entre ellas en el margen de inferior a 1 mm. Presentan el margen erosionado y mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, seco, fibriloso, claviforme, sólido y del mismo color que el píleo. Longitud de 5,95 cm y ancho de 1,6-2 cm (Fig.3.20.A). Color interno amarillo.

Esporas: Elipsoidales y lisas (Fig.3.19.C). Longitud 5-7,5 μm ancho 3,5-5 μm .

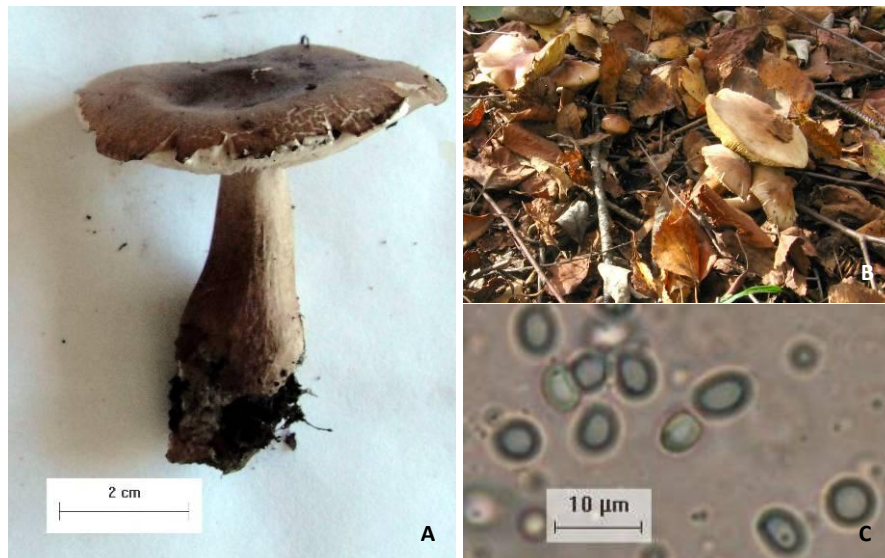


Fig.3.20.: A) *Tricholoma fuvulm*, B) Ejemplares entre la hojarasca de abedul, C) Esporas.

3.3.1.2. El Terronal

En este emplazamiento se recogieron 5 especies micorrícicas, ya encontradas en Nitrastur y descritas en el apartado anterior, y 1 saprófita. En la Tabla 3.2. se muestran las 5 zonas de recolección de este emplazamiento con sus coordenadas UTM y sexagesimales.

Tabla 3.2.: Coordenadas referidas al sistema ETRS89 de las zonas de recolección en El Terronal.

ZONAS	HUSO	UTM	LATITUD	LONGITUD
1	30	x = 274664,19 y = 4794382,68	43°16'6,82''N	5°46'35,87''W
2	30	x = 274639,54 y = 4794349,19	43°16'5,71''N	5°46'36,91''W
3	30	x = 274633,40 y = 4794361,12	43°16'6,09''N	5°46'37,20''W
4	30	x = 274588,91 y = 4794491,15	43°16'10,25''N	5°46'39,36''W
5	30	x = 274502,88 y = 4794538,53	43°16'11,69''N	5°46'43,24''W

En la figura 3.21. se muestra la localización de las setas recolectadas.

Amanita muscaria (L.) Lam.

Localización: Zona 4.

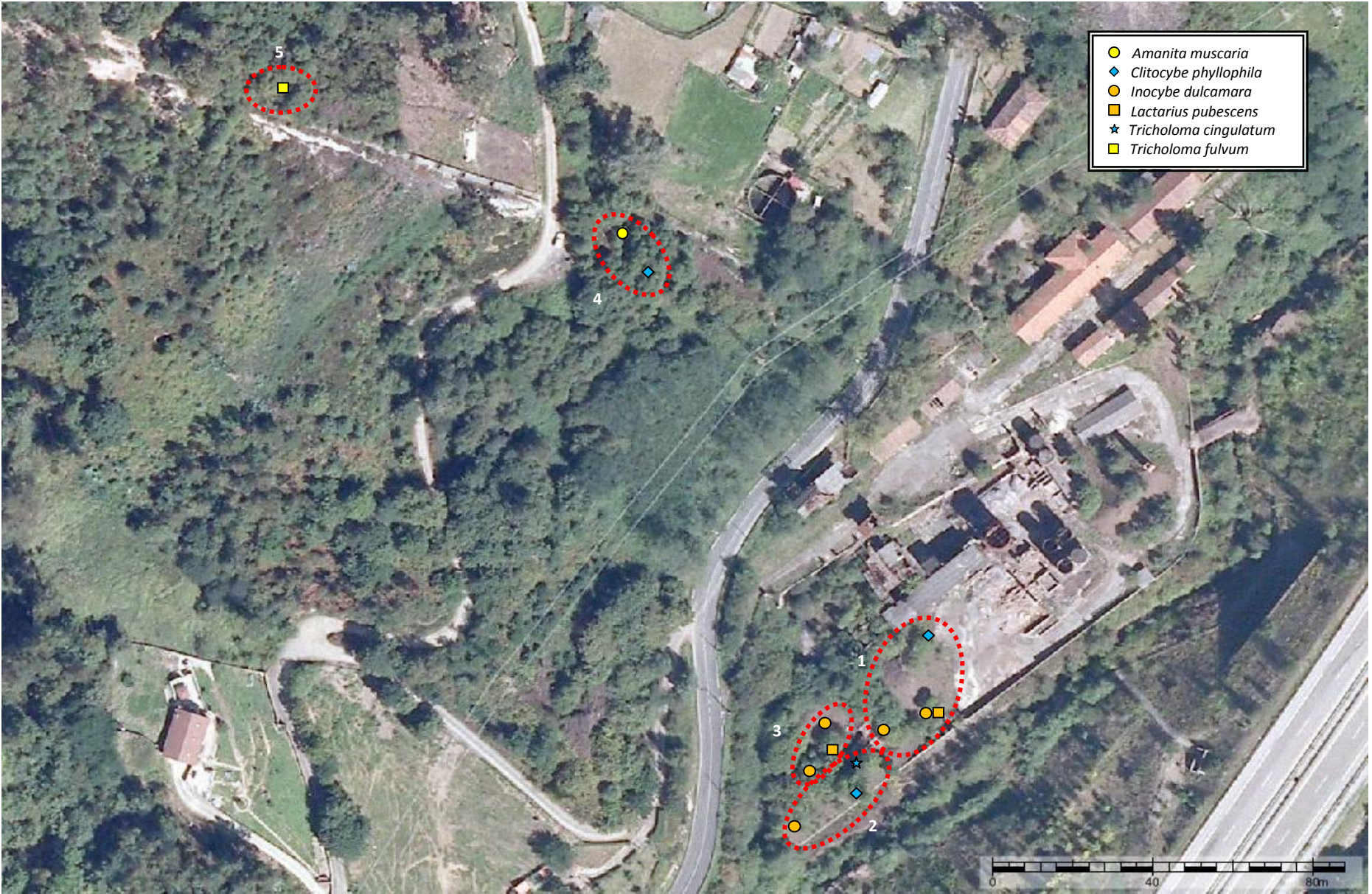
Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.22.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag. 39).



Fig.3.22.: *Amanita muscaria* entre hojarasca de abedul.

Fig. 3.21. Ortofografía del Terronal . Los números muestran las diferentes zonas de muestreo. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).



***Clitocybe phyllophilla* (Pers.) P. Kumm.**

Localización: Zona 1, 2 y 4.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Píleo: De color blanco, presenta un tamaño de unos 3-3,5 cm de diámetro, superficie seca y aterciopelada, convexo (Fig.3.23.A). Margen incurvado en sección y enrollado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente del mismo color blanco, densas, sinuadas y con el margen plano.

Estipe: Central, superficie seca, liso, sólido, igual, con el mismo color del píleo, longitud de 3-5 cm y ancho de 0,5-0,6 cm. Base del estipe cespitosa.

Esporas: Globosas amigdaliformes, lisas (Fig.3.23.B). Longitud 5-6 μm , ancho 3-4,5 μm .

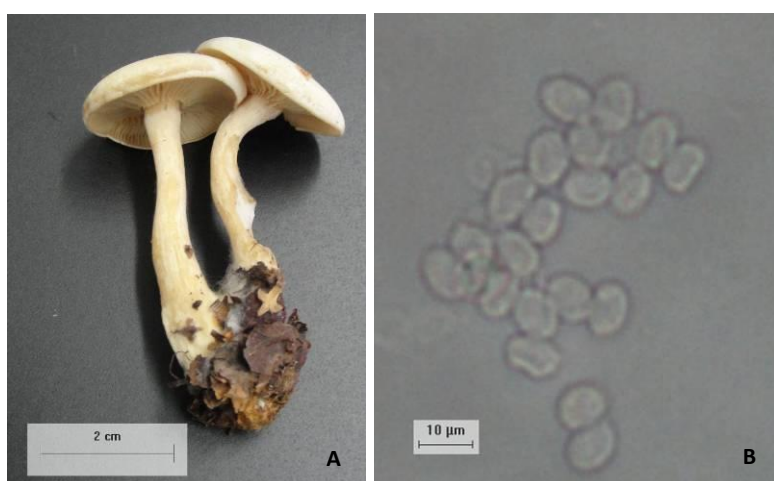


Fig.3.23.: A) *Clitocybe phyllophilla*, B) Esporas.

***Inocybe dulcamara* (Pers.) P. Kumm.**

Localización: Zona 1, 2 y 3.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinnerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *L. pubescens*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.24.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag. 44).



Fig.3.24.: *Inocybe dulcamara* desarrollado sobre escombro con escasa vegetación.

***Lactarius pubescens* Fr.**

Localización: Zona 1 y 3.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *L. dulcamara*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.25.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag.45-46).



Fig.3.25.: *Lactarius pubescens*.

***Tricholoma cingulatum* (Almfelt) Jacobashch**

Localización: Zona 2.

Posible especie hospedadora: *S. caprea*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.26.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag. 51).



Fig.3.26.: *Tricholoma cingulatum*.

***Tricholoma fulvum* (Fr.) Bigeard & H. Guill.**

Localización: Zona 5.

Posible especie hospedadora: *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.27.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag. 52).



Fig.3.27.: *Tricholoma fulvum* bajo abedul.

3.3.1.3. Olicio

En este emplazamiento se recogieron 4 especies micorrícicas y 4 saprófitas. En la Tabla 3.3. se muestran las 4 zonas de recolección de este emplazamiento con sus coordenadas UTM y sexagesimales. Las zonas 1, 2 y 4 están situadas en una ladera orientada al este. La 1 y 2 son zonas de bosque y la 4 de pradería. La zona 3 es llana y con uso ganadero.

Tabla 3.3.: Coordenadas referidas al sistema ETRS89 de las zonas de recolección en Olicio.

ZONAS	HUSO	UTM	LATITUD	LONGITUD
1	30	x = 328565,585 y = 4805260,77	43°22'50,63''N	5°6'58,89''W
2	30	x = 328577,19 y = 4805215,45	43°22'48,84''N	5°6'58,30''W
3	30	x = 328614,46 y = 4805210,61	43°22'48,71''N	5°6'56,65''W
4	30	x = 328585,34 y = 4805194,96	43°22'48,19''N	5°6'57,93''W

En la figura 3.21., se muestra la distribución de las setas recolectadas:

Fig. 3.28. Ortofogaría de Olicio . Los número muestras las diferentes áreas de muestreo. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).



***Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link**

Localización: Zona 1.

Posible especie hospedadora: *Pinus radiata* y *Quercus robur*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *Cortinarius* sp. y *Lactarius auranticus*.

Píleo: De color blanco amarillento, presenta un tamaño de 7-8 cm de diámetro. Superficie brillante, lisa, convexa en juveniles y ampliamente convexo en adulto (Fig.3.29.A). Margen decurvado en juvenil, y recurvado en adulto en sección y liso en juvenil, ondulado en adulto en vista lateral. Láminas de color blanco amarillento, densas, dispuestas regularmente con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres del mismo color y con el margen erosionado.

Estipe: Central, blanco tanto externa como internamente (Fig.3.29.A). Reacciona al H₂SO₄ concentrado. Seco, liso, hueco, anillo membranoso con borde sencillo, con la base bulbosa y volva marginada hundida. Longitud 14-15 cm, ancho 2,7-3 cm.

Esporas: Elipsoidales tendiendo a amigdaliformes y verrugosas (Fig.3.29.C). Largo 9-10 μm, ancho 6-7 μm.



Fig.3.29.: A) *Amanita phalloides*, B) Ejemplares entre las acículas de pino, C) Esporas.

***Cortinarius* sp.**

Localización: Zona 1.

Posible especie hospedadora: *Pinus radiata* y *Quercus robur*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. phalloides* y *L. auranticus*.

Píleo: De color marrón, presenta un tamaño de 3-4 cm de diámetro. Superficie seca, radialmente fibriloso, umbonado (Fig.3.30.A). Reacciona positivamente al KOH. Margen decurvado en sección y traslúcido estriado en vista lateral. Láminas de color marrón, densas, dispuestas regularmente, con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Sinuadas, del mismo color con el margen ondulado. Presenta fíbulas en las hifas de la lámina.

Estipe: Central, marrón claro tanto externa como internamente. Seco, fibroso, hueco e igual. Longitud 4-5 cm, ancho 0,5-0,7 cm.

Esporas: Elipsoidales, puntiformes, simétricas y muy oscuras (Fig.3.30.B). Largo 15-19 μm ancho 10-11 μm .



Fig.3.30.: A) *Cortinarius sp.*, B) Esporas.

***Hygrocybe chlorophana* (Fr.) Wünsche**

Localización: Zona 4.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Píleo: De color amarillo vivo, presenta un tamaño de unos 3 cm de diámetro, superficie viscosa y lisa, plano papilado (Fig.3.31.A). Margen incurvado en sección y con el margen enrollado en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color amarillo, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm, y a $\frac{1}{2}$ de distancia del margen a 3 mm. Adnadas, presentan el margen serrado y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, viscoso, sólido con el mismo color del píleo, tanto interna como externamente. Igual y liso, con la base inserta.

Esporas: Elipsoidales con ornamentación verrucosa (Fig.3.31.B). Longitud 8 μm , ancho 4,5 μm .



Fig.3.31.: A) *Hygrocybe chlorophana*, B) Esporas.

***Cuphophyllus virgineus* (Wulfen) Kovalenko**

Localización: Zona 4.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Píleo: De color blanco, presenta un tamaño de unos 1,5-4 cm de diámetro, superficie seca, pubescente y campanulada (Fig.3.32.A). Reacciona positivamente al KOH. Margen recurvado en sección y traslúcido estriado en vista lateral. Láminas distribuidas regularmente de color blanco, densas, con un espacio entre ellas en el margen de 2 mm. Decurrentes, presentan el margen plano y el mismo color en toda la lámina.

Estipe: Central, igual y liso, de color blanco tanto interna como externamente, con la base inserta. Con un tamaño entr 0,2-0,7 cm.

Esporas: Amigdaliformes y reticuladas (Fig. 3.32.B). Longitud 7-8 μm , ancho 4-5 μm .

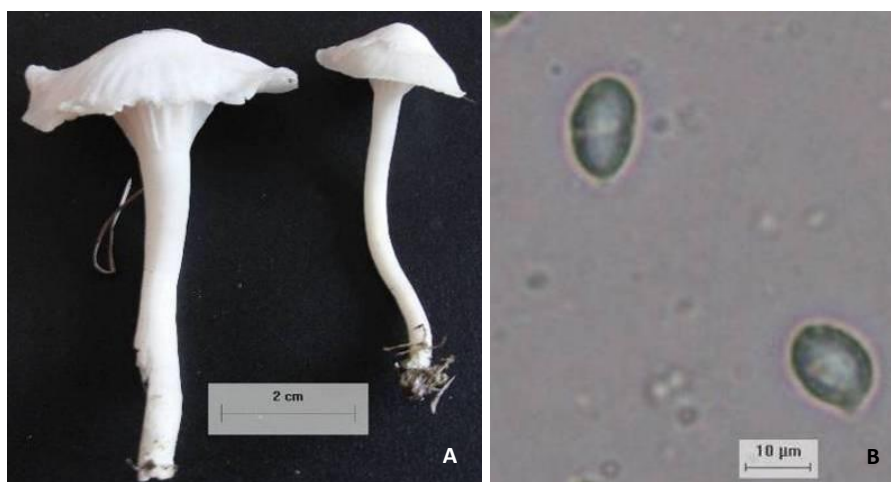


Fig.3.32.: A) *Cuphophyllus virgineus*, B) Esporas.

***Cuphophyllus pratensis* (Fr.) Bon**

Localización: Zona 4.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Píleo: De color anaranjado, presenta un tamaño de unos 3-4 cm de diámetro, superficie seca y lisa, umbonado (Fig.3.33.A). Reacciona positivamente al KOH. Margen decurvado en sección y liso en vista lateral. Láminas dispuestas regularmente de color blanco anaranjado, densas con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Decurrentes, presentan el margen plano.

Estipe: Central tendiendo a excéntrico, con el mismo color del píleo, longitud de 3-4 cm y ancho de 0,2-0,6 cm. Igual y liso con superficie seca. Color interno anaranjado.

Esporas: Globosas elipsoidales, con ornamentación puntiforme (Fig.3.33.B). Longitud 4-7 μm , ancho 2-5 μm .

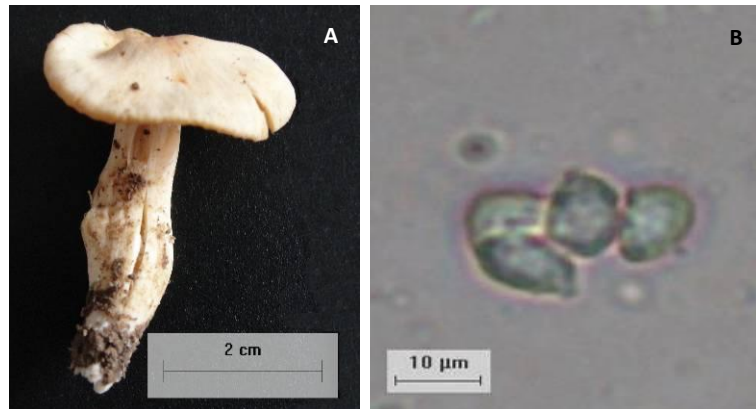


Fig.3.33.: A) *Cuphophyllus pratensis*, B) Esporas.

***Laccaria laccata* (Scop.) Cooke**

Localización: Zona 2.

Posible especie hospedadora: *Quercus robur*.

Mismas características macro y microscópicas (Fig.3.34.) que las descritas para las encontradas en Nitrastur (Pag. 44-45).



Fig.3.34.: *Laccaria lacatta*.

***Lactarius aurantiacus* (Pers.) Gray**

Localización: Zona 1 (Fig.3.34.B).

Posible especie hospedadora: *Pinus radiata* y *Quercus robur*.

Otras especies encontradas en la misma zona: *A. phalloides* y *Cortinarius* sp.

Píleo: De color pardo rojizo, presenta un tamaño de unos 2,5-4 cm de diámetro. Superficie seca, escrobiculado e infundibuliforme (Fig.3.34.A). Reacciona positivamente al KOH. Margen elevado en sección y enrollado en vista lateral. Láminas de color parduzco, densas con disposición regular, con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Adnadas, del mismo color y con el margen plano.

Estipe: Excéntrico, seco, liso, hueco y delgado en la base, del mismo color que el píleo. Base cespitosa. Longitud 2-3 cm, ancho 0,5-1 cm.

Esporas: Globosas y equinadas (Fig.3.34.C). Diámetro 10-11 μm .

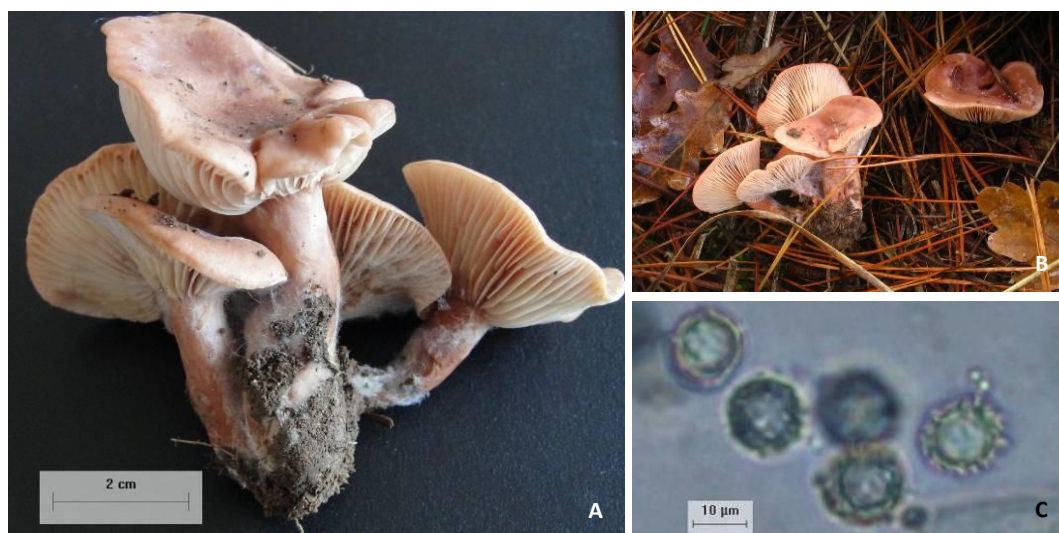


Fig.3.34.: A) *Lactarius auranticus*, B) Setas de campo, C) Esporas.

***Volvopluteus gloiocephalus* (DC.) Vizzini, Contu & Justo**

Localización: Zona 3.

Posible especie hospedadora: Saprófita.

Píleo: De color gris verdoso, presenta un tamaño de unos 6,5-7 cm de diámetro. Pegajoso, con la superficie lisa y plana (Fig.3.35.A). Margen plano en sección. Láminas de color blanco muy densas, distribuidas regularmente, con un espacio entre ellas en el margen inferior a 1 mm. Libres y del mismo color, presentan el margen crenado.

Estipe: Central, de color ocre externo, blanco interno, con la base bulbosa y volva sacciforme. Longitud 7-7,5 cm y ancho 1-1,5 cm. Liso y seco.

Esporas: Elipsoidales, cubierta oscura color marrón, lisas (Fig.3.35.B). Longitud 14-18 μm ancho 7-10 μm .

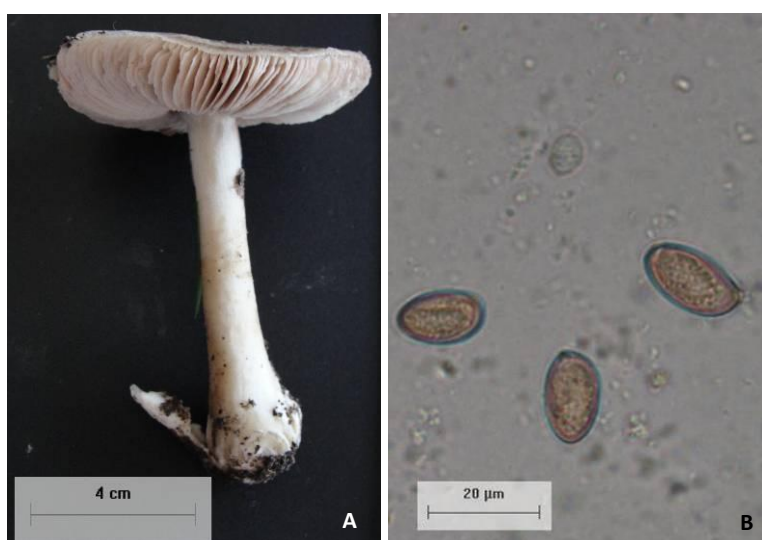


Fig.3.35.: A) *Volvopluteus gloiocephalus*, B) Esporas.

3.3.2. Determinación taxonómica

La Tabla 3.4. muestra la organización taxonómica del total de especies encontradas en los muestreos realizados durante 2011 a 2013 entre los meses de Octubre a Diciembre en los 3 emplazamientos:

Tabla 3.4.: Listado de especies recolectadas en los 3 emplazamientos durante 2011 a 2013. H M indica hongo micorrícico.

Emplazamiento	Orden	Familia	Especie	H M	2011	2012	2013
Nitrastur	Agaricales	Amanitaceae	<i>Amanita muscaria</i>	+	-	+	-
		Cortinariaceae	<i>Cortinarius alboviolaceus</i>	+	+	-	-
			<i>Cortinarius hemitrichus</i>	+	-	+	-
			<i>Cortinarius</i> sp.	+	-	+	-
			<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	+	-	+	-
			<i>Hebeloma mesophaeum</i>	+	+	+	-
			<i>Hebeloma sinapizans</i>	+	-	+	-
			<i>Inocybe dulcamara</i>	+	-	+	-
		Tricholomataceae	<i>Laccaria laccata</i>	+	+	+	-
			<i>Lepista flaccida</i>	-	+	-	-
	<i>Tricholoma cingulatum</i>		+	+	+	-	
	<i>Tricholoma fulvum</i>		+	+	+	-	
	Boletales	Boletaceae	<i>Leccinum scabrum</i>	+	-	+	-
		Paxillaceae	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	+	-	+	+
			<i>Paxillus cuprinus</i>	+	-	+	-
Suillaceae		<i>Suillus collinitus</i>	+	-	+	+	
Russulales	Russulaceae	<i>Lactarius pubescens</i>	+	+	+	-	
		<i>Russula versicolor</i>	+	-	+	-	
El Terronal	Agaricales	Amanitaceae	<i>A. muscaria</i>	+	-	+	-
		Cortinariaceae	<i>I. dulcamara</i>	+	-	+	-
		Tricholomataceae	<i>Clitocybe phyllophilla</i>	-	-	+	-
	<i>T. cingulatum</i>		+	-	+	-	
	Russulales	Russulaceae	<i>T. fulvum</i>	+	-	+	-
<i>L. pubescens</i>			+	-	+	-	
Olicio	Agaricales	Amanitaceae	<i>Amanita phalloides</i>	+	-	+	-
		Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i> sp.	+	-	+	-
		Hygrophoraceae	<i>Cuphophyllus pratensis</i>	-	-	+	-
			<i>Cuphophyllus virgineus</i>	-	-	+	-
			<i>Hygrocybe chlorophana</i>	-	-	+	-
	Tricholomataceae	<i>L. laccata</i>	+	-	+	-	
Pluteaceae	<i>Volvopluteus gloiocephalus</i>	-	-	+	-		
Russulales	Russulaceae	<i>Lactarius aurantiacus</i>	+	-	+	-	

3.3.3. Análisis de metales pesados

3.3.3.1. Análisis del contenido de metales mediante XRF

De las 26 especies se ha podido realizar la medición de metales en 14 de ellas. La Tabla 3.5. muestra los resultados obtenidos al secar a 70 °C setas procedentes de 6 especies recolectadas en Nitrastur, comparando el análisis realizado en el total de la seta con el realizado en la parte exterior. Para ver si existía variación en los resultados de acumulación dependiendo de la temperatura de secado se repitió el análisis en 3 de estas especies, secando los cuerpos fructíferos a 35 °C; obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 3.6. A partir de los resultados obtenidos en los análisis anteriores, decidimos tomar la temperatura de 35 °C como la mejor para el secado de las muestras, los resultados que se muestran en la Tabla 3.7. Se presentan en esta tabla las diferencias existentes entre las partes externas e internas de *A. Phalloides*. Adicionalmente se midieron los valores de acumulación de *P. involutus* procedente de una zona no contaminada como dato de referencia.

Tabla 3.5.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) medido mediante XRF en las muestras procedentes de Nitrastur secadas a 70 °C. T indica medición del Total de la seta y E partes externas. Letras diferentes entre una misma especie en un mismo metal indican diferencias significativas de acumulación entre las diferentes partes, $p=0,05$. Los Límites normales indican el contenido normal de cada metal en esporocarpos de zonas no contaminadas de Europa.

Límites normales			0-15	20-100	0,5 - 5	<2	1 - 5	<0,5 - 5	< 5	25 - 200
Zona muestreo	Especie	Parte medida	Ni	Cu	As	Se	Cd	Hg	Pb	Zn
Zona 4	<i>A. muscaria</i>	T	0 a	4 \pm 0,58 a	0 a	15,33 \pm 1,20 b	10,33 \pm 1,86 a	0 a	89,33 \pm 0,8 a	12,33 \pm 1,76 b
		E	0,67 \pm 0,33 a	0,67 \pm 0,33 a	0 a	20,67 \pm 1,45 a	8,33 \pm 1,45 a	0,67 \pm 0,33 a	91,33 \pm 2,73 a	148,33 \pm 1,33 a
Zona 7	<i>L. pubescens</i>	T	0,33 \pm 0,33 a	0 a	0 a	42,67 \pm 0,33 a	4,67 \pm 2,40 a	0 a	92,67 \pm 2,91 a	149 \pm 2,52 b
		E	0 a	0 a	0 a	47 \pm 1,53 a	5,33 \pm 0,33 a	0 a	87 \pm 0,58 a	169,33 \pm 1,76 a
Zona 2	<i>L. scabrum</i>	T	0 a	16,33 \pm 2,33 b	0 a	20 \pm 1,15 b	7,33 \pm 0,88 a	0 a	185,67 \pm 4,70 b	162 \pm 4,62 b
		E	2 \pm 0,58 a	29 \pm 1 a	0 a	28 \pm 1,53 a	9 \pm 1,15 a	0 a	228,67 \pm 2,85 a	182,67 \pm 3,38 a
Zona 6	<i>P. cuprinus</i>	T	3 \pm 0 a	32,33 \pm 4,91 a	0 a	6,33 \pm 1,45 b	1,67 \pm 1,67 a	0 a	83,33 \pm 3,53 a	156,33 \pm 9,56 a
		E	2,33 \pm 0,67 a	44 \pm 3 a	0 a	11 \pm 1 a	8 \pm 2,98 a	0 a	90,67 \pm 4,33 a	174,67 \pm 2,96 a
Zona 6	<i>T. cingulatum</i>	T	5,67 \pm 0,33	2,33 \pm 0,88	0	0,33 \pm 0,33	6,67 \pm 1,45	0	90,33 \pm 1,20	218 \pm 3,61
Zona 9	<i>T. fulvum</i>	T	0	9,67 \pm 1,67	0	2,67 \pm 0,33	9,67 \pm 1,20	0	92 \pm 2,08	144,33 \pm 1,45

Tabla 3.6.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) medido mediante XRF en las muestras procedentes de Nitrastur secadas a 70 °C y 35 °C. Letras diferentes entre una misma especie en un mismo metal indican diferencias significativas en acumulación en una especies secada a diferentes T°, $p=0,05$. Los límites normales indican el contenido normal de cada metal en esporocarpos de zonas no contaminadas de Europa.

Límites normales			0-15	20-100	0,5 - 5	<2	1 - 5	<0,5 - 5	< 5	25 - 200
Zona muestreo	Especie	T°	Ni	Cu	As	Se	Cd	Hg	Pb	Zn
Zona 7	<i>L. pubescens</i>	70 °C	0,33 \pm 0,33 a	0 a	0 a	42,67 \pm 0,33 a	4,67 \pm 2,40 a	0 a	92,67 \pm 2,91 a	149 \pm 2,52 a
		35 °C	0,33 \pm 0,33 a	0 a	0 a	47 \pm 0,67 b	6,67 \pm 2,40 a	0 a	100 \pm 0,58 a	170 \pm 2,33 b
Zona 6	<i>P. cuprinus</i>	70 °C	3 \pm 0 a	32,33 \pm 4,91 a	0 a	6,33 \pm 1,45 a	1,67 \pm 1,67 a	0 a	83,33 \pm 3,53 a	156,33 \pm 9,56 a
		35 °C	4,67 \pm 0,67 a	72,67 \pm 2,60 b	0 a	6,33 \pm 1,33 a	6,33 \pm 4,10 a	0 a	153 \pm 4,73 b	204 \pm 7,51 a
Zona 6	<i>T. cingulatum</i>	70 °C	5,67 \pm 0,33 a	2,33 \pm 0,88 a	0 a	0,33 \pm 0,33 a	6,67 \pm 1,45 a	0 a	90,33 \pm 1,20 a	218 \pm 3,61 a
		35 °C	6 \pm 0,58 a	33,33 \pm 1,45 b	2 \pm 2 a	0 a	5 \pm 2,08 a	0 a	94,67 \pm 2,19 b	233 \pm 9,02 b

Tabla 3.7.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) medido mediante XRF en las muestras procedentes de de los 3 emplazamientos secadas a 35 °C. T indica medición del total de la seta e I parte interna. Letras diferentes entre una misma especie en un mismo metal indican diferencias significativas en la acumulación entre las diferentes partes, $p=0,05$. Los límites normales indican el contenido normal de cada metal en esporocarpos de zonas no contaminadas de Europa.

Límites normales			0-15	20-100	0,5 – 5	<2	1 - 5	<0,5 - 5	< 5	25 – 200
Zona muestreo	Especie	Parte medida	Ni	Cu	As	Se	Cd	Hg	Pb	Zn
Navia	<i>P. involutus</i>	T	2,33 \pm 0,67	43 \pm 2,08	0	0	3,67 \pm 2,03	0	79 \pm 2,89	124,33 \pm 1,76
Nitrastur Zona 4	<i>C. hemitrichus</i>	T	3,33 \pm 0,33	7,33 \pm 1,76	0	1,33 \pm 0,67	14,67 \pm 2,60	0	106,67 \pm 0,67	207,67 \pm 2,91
Nitrastur Zona 6	<i>H. mesophaeum</i>	T	1,33 \pm 0,33	13,33 \pm 1,67	0	2,67 \pm 0,67	17,67 \pm 3,28	0	93 \pm 2,08	478,67 \pm 11,26
Nitrastur Zona 2	<i>H. sinapizans</i>	T	3,33 \pm 0,33	264 \pm 10,58	0	94,67 \pm 2,19	13 \pm 4,16	0	136,33 \pm 8,11	442 \pm 10,69
Nitrastur Zona 2	<i>I. dulcamara</i>	T	1 \pm 0,58	45,67 \pm 2,73	0	4 \pm 0,58	14 \pm 2,08	0	93,67 \pm 1,76	234 \pm 0,58
Terronal Zona 4	<i>A. muscaria</i>	T	1,33 \pm 0,88	48,33 \pm 3,33	0	1 \pm 1	17,33 \pm 7,62	333 \pm 6,51	80,67 \pm 2,19	264 \pm 2,52
Terronal Zona 1	<i>I. dulcamara</i>	T	1,33 \pm 0,88	41,33 \pm 1,76	0	0	7,33 \pm 2,03	0	71 \pm 3,46	242,33 \pm 4,91
Terronal Zona 3	<i>I. dulcamara</i>	T	2 \pm 1,15	21,67 \pm 2,19	0	17,67 \pm 1,33	8,67 \pm 4,48	0	64,33 \pm 1,67	150,33 \pm 2,33
Terronal Zona 1	<i>L. pubescens</i>	T	0,33 \pm 0,33	0	0	0	7 \pm 1,53	0	83,33 \pm 1,45	116,67 \pm 0,88
Terronal Zona 3	<i>L. pubescens</i>	T	0	0	0	2 \pm 0,58	12,67 \pm 1,45	0	94,33 \pm 3,28	128,33 \pm 3,28
Terronal Zona 2	<i>T. cingulatum</i>	T	5 \pm 1,53	0	0	0	14,67 \pm 2,33	0	79,67 \pm 3,18	487 \pm 10,26
Olicio Zona 1	<i>A. phaloides</i>	I	1 \pm 1 a	0 a	0 a	0 a	9,33 \pm 5,49 a	0 a	69 \pm 2,89 a	42 \pm 0,58 a
Olicio Zona 1	<i>A. phaloides</i>	E	1,33 \pm 0,33 a	11 \pm 0,58 b	0 a	0 a	5 \pm 2 a	0 a	81 \pm 1,73 b	65,67 \pm 1,76 b
Olicio Zona 1	<i>L. auranticus</i>	T	3 \pm 0,58	8 \pm 0	0	5,33 \pm 0,33	8,67 \pm 6,23	13 \pm 2,08	117 \pm 1,73	154 \pm 1,15
Olicio Zona 3	<i>V. gloiocephalus</i>	T	2 \pm 1,15	37 \pm 1	27,33 \pm 2,40	0	5,67 \pm 5,17	0	68,33 \pm 2,60	147,33 \pm 1,20

3.3.3.2. Análisis ICP-MS

Para comprobar la fiabilidad de la metodología del análisis de metales pesados en esporocarpos por medio de XRF, se realizaron nuevos análisis, pero en esta ocasión por medio de ICP-MS.

3.3.3.2.1. Efecto de la Temperatura en el análisis de metales

Para determinar el efecto de la temperatura de secado en la diferente acumulación observadas mediante XRF, se emplearon setas de *P. cuprinus* secadas a 35 y a 70 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) en *P. cuprinus* secado a 35 y 70 °C mediante ICP-MS. Los límites normales indican el contenido habitual de cada metal en esporocarpos de zonas no contaminadas de Europa.

	<i>P. cuprinus</i> (35 °C)	<i>P. cuprinus</i> (70 °C)	Límites normales
Fe	1069,94 \pm 42,31	233,8 \pm 7,39	50 – 300
Mn	8,82 \pm 0,34	6,03 \pm 0	10 – 60
Cu	132,62 \pm 5,39	77,77 \pm 0,17	20 – 100
Zn	221,67 \pm 8,51	167,79 \pm 0,53	25 – 200
As	28,30 \pm 0,89	9,64 \pm 0,02	0,5 – 5
Se	9,79 \pm 0,13	10,54 \pm 0,07	<2
Cd	0,85 \pm 0,03	1,6 \pm 0	1 – 5
Hg	1,10 \pm 0,07	1,75 \pm 0,02	<0,5 – 5
Pb	61,36 \pm 2,66	10,93 \pm 0,09	< 5

Con estos resultados decidimos repetir las mediciones por triplicado y descartar un posible error metodológico. En la Tabla 3.9. se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.9.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) mediante ICP-MS. Se ha realizado la Prueba T de Student para muestras apareadas, $p=0,05$.

	<i>P. cuprinus</i> (35 °C)	<i>P. cuprinus</i> (70 °C)	T	Sig.
Cu	119,53 \pm 2,21	78,12 \pm 1,47	15,58	0
Zn	179,97 \pm 1,64	139,9 \pm 0,58	29,09	0
As	32,88 \pm 1,33	10,07 \pm 0,47	19,31	0
Se	8,63 \pm 0,24	9,73 \pm 0,23	-4,3	0,01
Cd	0,8 \pm 0,02	1,22 \pm 0,05	-8,73	0
Hg	1,52 \pm 0,06	2,73 \pm 0,15	-9,35	0
Pb	98,63 \pm 1,76	8,62 \pm 0,88	56,464	0

Por último para determinar si las diferencias observadas eran productos del origen de la muestra, la muestra secada a 35 °C de *P. cuprinus* se dividió a la mitad, se rehidrató y una parte se volvió a secar a 35 °C y la otra a 70 °C, ambas durante 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.10.:

Tabla 3.10.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) mediante ICP-MS.

	<i>P. cuprinus</i> (35 °C)	<i>P. cuprinus</i> (70 °C)
Cu	118,56 \pm 2,29	105,4 \pm 10
Zn	237,8 \pm 3,56	204,92 \pm 26,42
As	30,06 \pm 0,08	25,1 \pm 2,81
Se	9,87 \pm 0,15	8,68 \pm 1,17
Cd	0,73 \pm 0,03	0,6 \pm 0,1
Hg	1,21 \pm 0,04	0,95 \pm 0,13
Pb	90,97 \pm 0,31	72,19 \pm 8,58

A partir de los resultados obtenidos mediante XRF, se seleccionaron 4 muestras para ser analizadas mediante ICP-MS: *A. muscaria* (El Terronal), *L. scabrum* (Nitrastur), *V. gloiocephalus* (Olicio) más la muestra control de *P. involutus* todas secadas a 35° C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) mediante ICP-MS. Los límites normales indican el contenido normal de cada metal en esporocarpos de zonas no contaminadas de Europa.

	<i>A. muscaria</i>	<i>L. scabrum</i>	<i>V. gloiocephalus</i>	<i>P. involutus</i>	Límites normales
Fe	126,3 \pm 0,89	103,89 \pm 0,39	410,26 \pm 0,18	277,44 \pm 14,30	50 – 300
Mn	13,61 \pm 0,03	3,73 \pm 0,01	31,67 \pm 0,03	-----	10 – 60
Cu	69,57 \pm 0,35	35,41 \pm 0,07	54,43 \pm 0,16	115,54 \pm 5,71	20 – 100
Zn	211,3 \pm 0,86	109,36 \pm 0,06	118,22 \pm 0,21	178,80 \pm 8,99	25 – 200
As	12,97 \pm 0,38	11,31 \pm 0,07	92,17 \pm 0,28	1,67 \pm 0,05	0,5 – 5
Se	2,15 \pm 0,09	11,69 \pm 0,07	0,34 \pm 0,02	-----	<2
Cd	8,36 \pm 0,02	4,13 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	1 – 5
Hg	119,58 \pm 6,53	1,31 \pm 0,02	3,81 \pm 0,02	0,01 \pm 0	<0,5 – 5
Pb	0,19 \pm 0	58,27 \pm 0,25	0,88 \pm 0	2,07 \pm 0,11	< 5

Con todo ello para conocer lo similares que son los datos de ambas técnicas y si estos están correlacionados se ha realizado una matriz de disimilitud independientemente de la especie y solo teniendo en cuenta el metal, basada en la distancia euclídea, el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación corregido. Los resultados se muestran en la Tabla 3.12.:

Tabla 3.12.: Media \pm error típico de la concentración de metales (mg Kg^{-1}) mediante ICP-MS y XRF, comparadas mediante matriz de disimilitud (Distancia), Coeficiente de Correlación de Pearson (R) y Coeficiente de determinación corregido (R^2). * La correlación es significativa al 0,05; ** la correlación es significativa al 0,01.

Especie	Cu		Zn		As		Se		Cd		Hg		Pb	
	ICP	XRF	ICP	XRF	ICP	XRF	ICP	XRF	ICP	XRF	ICP	XRF	ICP	XRF
<i>A. muscaria</i>	69,57 \pm 0,35	48,33 \pm 3,33	211,3 \pm 0,86	264 \pm 2,52	12,97 \pm 0,38	0	2,15 \pm 0,09	1 \pm 1	8,36 \pm 0,02	17,33 \pm 7,62	119,58 \pm 6,53	333 \pm 6,51	0,19 \pm 0	80,67 \pm 2,19
<i>L. scabrum</i>	35,41 \pm 0,07	16,33 \pm 2,33	109,36 \pm 0,06	162 \pm 4,62	11,31 \pm 0,07	0	11,69 \pm 0,07	20 \pm 1,15	4,13 \pm 0,01	7,33 \pm 0,88	1,31 \pm 0,02	0	58,27 \pm 0,25	185,67 \pm 4,62
<i>P. cuprinus</i> (35 °C)	132,62 \pm 5,39	72,67 \pm 2,60	221,67 \pm 8,51	204 \pm 7,51	28,30 \pm 0,89	0	9,79 \pm 0,13	6,33 \pm 1,33	0,85 \pm 0,03	6,33 \pm 4,10	1,10 \pm 0,07	0	61,36 \pm 2,66	153 \pm 4,73
<i>P. cuprinus</i> (70 °C)	77,77 \pm 0,17	32,33 \pm 4,91	167,79 \pm 0,53	153,33 \pm 9,50	9,64 \pm 0,02	0	10,54 \pm 0,07	6,33 \pm 1,45	1,6 \pm 0	1,67 \pm 1,67	1,75 \pm 0,02	0	10,93 \pm 0,09	83,33 \pm 9,50
<i>V. gloiocephalus</i>	54,43 \pm 0,16	37 \pm 1	118,22 \pm 0,21	147,33 \pm 1,2	92,17 \pm 0,28	27,33 \pm 2,4	0,34 \pm 0,02	0	0,43 \pm 0,02	5,67 \pm 5,17	3,81 \pm 0,02	0	0,88 \pm 0	68,33 \pm 2,6
<i>P. involutus</i> (35 °C Control)	115,54 \pm 5,71	43 \pm 2,08	178,80 \pm 8,99	124,33 \pm 1,76	1,67 \pm 0,05	0	0	-----	0,13 \pm 0,01	3,67 \pm 2,03	0,01 \pm 0	0	2,07 \pm 0,11	79 \pm 2,89
Distancia	109,73		99,42		73,46		10,01		12,68		213,47		216,37	
R	0,83*		0,60		0,97**		0,79		0,90*		1**		0,96**	
R ²	0,62		0,20		0,92		0,50		0,76		0,99		0,91	
Ecuación de la recta	ICP = 12,75 + 1,64XRF		ICP = 71,06 + 0,55XRF		ICP = 12,78 + 2,90XRF		ICP = 3,40 + 0,52XRF		ICP = -1,07 + 0,52XRF		ICP = 1,60 + 0,35XRF		ICP = -40,67 + 0,58 XRF	

3.4. Discusión

De las especies presentes en Nitrastur, 12 pertenecen al orden Agaricales (*Amanita muscaria*, *Cortinarius* sp., *C. alboviolaceus*, *C. hemitrichus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *H. mesophaeum*, *H. sinapizans*, *Inocybe dulcamara*, *Laccaria lacatta*, *Lepista flaccida*, *Tricholoma cingulatum* y *T. fulvum*), 5 a Boletales (*Leccinum scabrum*, *Paxillus ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *Scleroderma citrinum* y *Suillus collinitus*) y tan solo 2 a Russulales (*Lactarius pubescens* y *Russula versicolor*). Salvo *L. flaccida*, el resto de las especies corresponden con hongos ectomicorrícicos. Las familias más abundantes han sido Cortinariaceae con 6 especies, seguido de Tricholomataceae con 4, siendo *T. cingulatum* especie perteneciente a esta última familia la más abundante apareciendo en 8 zonas del emplazamiento.

En el Terronal, el orden Agaricales es el más abundante con 5 especies (*A. muscaria*, *Clitocybe phyllophilla*, *I. dulcamara*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*), mientras que el orden Russulales solo está representado por *L. pubescens*. Todas estas especies se corresponden con hongos ectomicorrícicos excepto *C. phyllophilla*. La familia más abundante es Tricholomataceae con 3 especies, y la especie más abundante fue *I. dulcamara*, apareciendo en 3 zonas dentro del emplazamiento.

Por último en Olicio, 7 de las especies pertenecen al orden Agaricales (*Amanita phalloides*, *Cortinarius* sp., *Cuphophyllum pratensis*, *Cuphophyllum virgineus*, *Hygrocybe chlorophana*, *L. lacatta* y *Volvopluteus gloiocephalus*); con tan solo 1 especie del orden Russulales (*Lactarius aurantiacus*). La familia más abundante es Hygrophoraceae con 3 especies. Este emplazamiento es el que mayor número de especies saprófitas presenta, 4 en total (*C. pratensis*, *C. virgineus*, *H. chlorophana* y *V. gloiocephalus*).

Estos datos ponen de manifiesto que los Agaricales son el orden dominante en los 3 emplazamientos, coincidiendo estos datos con los de Tarvainen *et al.* (2003), en los que este orden supone el 68% del total de la diversidad en zonas contaminadas por actividad industrial. Este orden constituye el clado más amplio de hongos formadores de setas incluyendo más de la mitad de las especies de Homobasidiomycetes conocidas (Hibbett *et al.*, 1997; Hibbett y Thorn, 2001). Su clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos y en las coloraciones de las esporas (Singer, 1986), provoca continuas reorganizaciones de géneros, familias y especies, haciendo necesaria la incorporación del análisis de secuencias para poder estudiar estas especies con más detalle (Matheny *et al.*, 2006).

Otra característica observada es la similitud de especies encontradas en Nitrastur y El Terronal con 5 especies en común (*A. muscaria*, *I. dulcamara*, *L. pubescens*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*). Por el contrario, entre estos dos emplazamientos y el de Olicio existen bastantes diferencias ya que solo se encontró a *L. lacatta* como única especie común entre Olicio y Nitrastur. Este hecho puede deberse a la proximidad geográfica existente entre Nitrastur y El Terronal (unos 8 Km) y por tanto a unas condiciones climáticas (como ya se indicó en el Capítulo 2) y vegetación similares. Nitrastur y El Terronal están totalmente abandonados, y han sido colonizados de una manera natural por especies pioneras autóctonas como *Betula celtiberica*, *Salix atrocinnerea*, *Salix caprea* y otras invasoras alóctonas como *Cortaderia selloana* y *Buddleja davidii*. En Olicio aunque la actividad de la mina haya finalizado, parte de sus terrenos están siendo utilizados como pasto para el ganado vacuno, presentando grandes zonas del emplazamiento vegetación herbácea, lo que explicaría el mayor número de especies saprófitas encontradas con respecto a los otros emplazamientos, siendo todas las encontradas típicas de prados nitrófilos. En este emplazamiento se encuentra una pequeña mancha forestal,

de *Quercus robur* y *Pinus radiata*, ubicada encima de la chimenea del antiguo horno metalúrgico de mufla. La diferencia entre las especies ectomicorrícicas encontradas en este emplazamiento, y las localizadas en Nitrastur y El Terronal, pueden deberse por tanto a las diferencias de clima, suelo y vegetación.

Del total de las especies identificadas, se ha podido realizar el análisis del contenido en metales pesados de 14 de ellas mediante XRF. Es la primera vez, que tengamos noticias, que se utiliza esta técnica para el análisis de esporocarpos mediante un analizador modelo XMET 5100 X-Ray Fluorescence de Oxford Instruments, un aparato de pequeño tamaño y portátil. Los trabajos previos (Campos *et al.*, 2009) utilizan el modelo PHILIPS-PW2404 Pananalytical, Magix-Pro model, un modelo fijo de gran tamaño, teniendo que mezclar las muestras con metil-metacrilato para generar la cantidad mínima necesaria para poder analizarla en ese sistema. Al igual que ellos, nos hemos encontrado como factor limitante la cantidad mínima necesaria para realizar el análisis, determinando que necesitábamos obtener un grosor mínimo de 1,5 cm de alto para asegurarnos de que la medición era de la muestra y no de la superficie sobre la que la medíamos. Debido a esta razón especies de pequeño porte (*C. albobiolocaeus*, *Cortinarius* sp., *C. philophyla*, *C. pratensis*, *C. virgineus*, *H. crustuliniforme*, *H. chlorophana*, *L. lacatta* y *L. flaccida*) o de las que se encontró un escaso número de carpóforos (*P. ammoniavirescens*) no han podido ser analizadas. De la misma manera, no se han podido analizar otras especies de mayor porte o que presentaban mayor número de cuerpos fructíferos (*R. versicolor*, *S. collinitus* y *S. citrinum*), por el estado que presentaban (larvas de insectos, pudrición, etc).

Aun sin poder determinar su contenido en metales, la presencia de estas especies en zonas altamente contaminadas, nos indica la capacidad que poseen para tolerar esas elevadas concentraciones de metal. Más aún, algunas de estas especies han sido descritas como bioacumuladores, como el caso de la *L. flaccida* (syn. *L. inversa*), capaz de acumular niveles elevados de Fe (İşiloğlu *et al.*, 2001), Ag (Borovička *et al.*, 2010) y Br (Stijve *et al.*, 1998) o *C. albobiolocaeus* que fue encontrado a los 2 años del accidente de Chernobyl (Bakken y Olsen, 1990) acumulando niveles significativos de ^{134}Cs (Cesio radioactivo), Ca y Mn. En este mismo emplazamiento estudiando la acumulación en plantas de *Picea abies* de ^{134}Cs (Brunner *et al.*, 1996) y ^{85}Sr (Estroncio) (Riesen y Brunner, 1996), se observó que las plantas inoculadas con *H. crustuliniforme* presentaban niveles menores de concentración que las plantas control, encontrándose el ^{134}Cs acumulado en las vacuolas y el ^{85}Sr en las partículas electrón-densas y gránulos ricos en fósforo (Frey *et al.*, 1997) de las hifas de la red de Hartig.

Aunque se considera que la capacidad de resistencia a los metales es genéticamente inherente a las especies, se ha observado una alta variabilidad intraespecífica (Meharg y Cairney, 2000; Sharples *et al.*, 2001). Muchos trabajos sugieren que posiblemente como resultado de la adaptación de las especies a suelos altamente contaminados, aparecerían ecotipos resistentes (Colpaert y van Assche, 1987; Colpaert *et al.*, 2000). Debido a ello, una vez identificadas estas especies sería necesario comprobar que niveles de acumulación presentan en cada emplazamiento para determinar su posible empleo en programas de biorremediación.

Por otro lado aunque es bien conocida la elevada concentración de metales que los cuerpos fructíferos son capaces de acumular, especialmente en zonas muy contaminadas, no existen límites de referencia que podamos tomar para determinar si estas especies pueden considerarse como bioacumuladoras. Es por ello que utilizamos los límites propuestos por Kalač (2010) como usuales en setas comestibles de zonas no contaminadas en Europa, como medida comparativa. Estos límites se elaboraron realizando una recopilación de los valores de acumulación obtenidos mediante diferentes técnicas analíticas, así como utilizando diferentes

metodologías a la hora de procesar y secar las muestras, no existiendo una comparativa entre técnicas analíticas que valide los resultados.

Una gran variedad de hongos presentan diferentes sistemas de movilización de metales pesados como la quelación, la emisión de metabolitos, sideróforos, metilación de metales y organometales o reacciones de óxido-reducción que pueden resultar en la volatilización de los mismos (Gadd, 2007; Harms *et al.*, 2011). Asimismo diferentes especies fúngicas son capaces de llevar a cabo la inmovilización de metales mediante su unión a la paredes celulares o pigmentos, captación intracelular o la formación de minerales micogénicos o minerales secundarios, orgánicos e inorgánicos (principalmente oxalatos y carbonatos), generando en ocasiones la precipitación o cristalización en la pared celular de minerales evaporables como el yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y óxidos de hierro (magnetita, Fe_3O_4) (Gorbushina *et al.*, 2002).

Existen trabajos que ponen de manifiesto diferencias en la acumulación de metales entre las diferentes partes que constituyen una seta. Analizando de forma separada estipe, sombrero e himenóforo y encontrando mayor acumulación en estas dos últimas estructuras (Alonso *et al.*, 2003; García *et al.*, 2008). Sin embargo, creemos que no existen trabajos en los que se ponga de manifiesto una posible diferencia entre partes de la seta expuestas al exterior y zonas internas.

Es por estas razones que nos planteamos en primer lugar determinar si la temperatura de secado podía afectar al contenido de metales de las muestras analizada, y en segundo si la acumulación de los tejidos expuestos al exterior varía con respecto al contenido total o interior de la seta.

En primer lugar analizamos 6 especies (*A. muscaria*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. cuprinus*, *T. cingulatum* y *T. fulvum*) de Nitrastur secadas a 70 °C, examinando adicionalmente la parte externa y el total de la seta para 4 de ellas (*A. muscaria*, *L. pubescens*, *L. scabrum* y *P. cuprinus*). Los resultados presentados en la Tabla 3.5. muestran que las 6 especies exceden los niveles normales propuestos por Kalač para al menos 2 metales. Si comparamos los resultados de acumulación entre parte externa y total del carpóforo vemos que para *A. muscaria* existe una acumulación externa significativamente mayor para el Se y Zn, en *L. pubescens* para el Zn, en *L. scabrum* para el Se, Pb, Zn y Cu y por último en *P. cuprinus* para el Se. Estos resultados parecen indicar, que las partes expuestas al exterior presentan una mayor acumulación, por lo menos en el caso del Se, el Zn y el Cu.

A pesar de que en el caso del Se, no existen trabajos con los que podamos contrastar nuestros resultados, parece claro que existe una diferencia en su distribución siendo siempre mayor en las partes externas de las 4 especies comparadas y presentando diferencias significativas en 3 de ellas. Para el caso del Cu y Zn estos datos se ven confirmados en parte por el trabajo de Alonso *et al.* (2003), donde encuentran una acumulación significativa de ambos metales en los himenóforos con respecto al resto del cuerpo fructífero, justificando su acumulación en esta zona por una mayor actividad biológica con respecto al resto de la seta (Chang y Chang, 1973). Nuestros datos muestran que esa diferencia no solo está asociada al himenóforo, sino al conjunto de las partes externas. Esto podría explicarse no por la elevada actividad biológica de estas zonas, sino porque las partes externas están en contacto directo con el medio. Se ha descrito la elevada capacidad de biosorción que presenta la biomasa fúngica tanto viva como muerta, mediante la unión de los metales a sitios específicos en las paredes celulares, como melanina y quitina, constituyendo un mecanismo pasivo de inmovilización de metales (Gadd, 1993a; Sterflinger, 2000). Más aun, se ha visto que la pared celular desarrolla un papel clave en la acumulación de Cu (entre 38-77% del contenido total)

en los hongos de pudrición de la madera (Baldrian, 2003). Así pues, resultaría lógico pensar que las hifas expuestas al exterior pudieran presentar mayor cantidad de metal inmovilizado que las presentes en el interior.

Una vez determinada la acumulación de las 6 especies anteriores, secadas a 70 °C, se volvieron a analizar 3 de ellas (*L. pubescens*, *P. cuprinus* y *T. cingulatum*), pero esta vez secadas a 35 °C. Los resultados tal como se ve en la Tabla 3.6., muestran para el caso del *L. pubescens*, niveles significativamente superiores de Se y Zn en las muestras secadas a 35 °C. Para *P. cuprinus* estas diferencias se observan para el Pb. Y por último en *T. cingulatum*, se observan niveles significativamente superiores a 35 °C de Pb, Zn y Cu. En ninguna de las 3 especies estudiadas se han obtenido niveles superiores de los metales analizados para las muestras secadas a 70 °C. Estos resultados son sorprendentes ya que la mayor variación ha sido en Pb, Zn y Cu, metales en los que a priori no esperábamos variación entre las diferentes temperaturas de secado. Para comprobar que las diferencias observadas eran debidas a la temperatura de secado y no al método de análisis con XRF, se hizo una cuantificación de los metales pesados acumulados por *P. cuprinus* mediante ICP-MS a ambas temperaturas, lo que se discutirá más adelante.

Con estos datos decidimos tomar la temperatura de 35 °C como la idónea para este tipo de muestras, decidiendo utilizar una muestra control propia tanto para valorar la fiabilidad del XRF, como para utilizarla de nivel de referencia. En concreto se utilizó *P. involutus* secada a 35 °C recogida en la ribera del río Navia (Concejo de Navía, Asturias) bajo un eucalipto, en terrenos naturales y sin aparente contaminación de ningún tipo. Los resultados obtenidos (Tabla 3.7.) nos muestran en primer lugar que si comparamos los datos de acumulación de los diferentes metales de los 3 emplazamientos y los de la muestra control con los límites propuestos por Kalač, todos los datos parecen ser lógicos excepto en el caso del Pb. Para este metal el límite usual es $< 5 \text{ mg Kg}^{-1}$ encontrando 79 mg Kg^{-1} en la especie control y niveles muy elevados para el resto de especies analizadas, por lo que parece que el XRF estaría sobreestimando el contenido de Pb. Obviando este metal, todas las muestras analizadas excepto la parte externa de *A. phalloides* exceden en al menos 1 metal los límites propuestos por Kalač, excediendo todas ellas incluida la parte externa de *A. phalloides* los niveles de acumulación que presenta la especie control en al menos 1 metal. De esta última especie, debido a su gran porte pudimos separar tejidos internos y externos, y comparar su diferente capacidad de acumulación. Los resultados muestran que de los 5 metales de acumuló, el Zn y Cu se acumulan significativamente más en los tejidos externos, corroborado estos datos los obtenidos de los ejemplares de Nitrastur.

De los hongos recolectados en Nitrastur, *H. sinapizans* es el que más metales acumula, excediendo los límites para Cu, Se, Cd y Zn, seguida de *H. mesopaheum*, *I. dulcamara*, *P. cuprinus*, que superan los límites de Se, Cd y Zn metales. En Olicio, *L. auraticus* es la que más acumula, superando los niveles de Se, Cd y Zn y en El Terronal, *A. muscaria* con Cd, Hg y Zn. Si analizamos metal por metal, *T. cingulatum*, tanto de Nitrastur como de El Terronal, es el hongo que más Ni acumula aunque sin superar los límites normales; *H. mesopaheum* acumula más Cd y Zn; *H. sinapizans* Cu y Se; *A. muscaria*, del Terronal, hiperacumula Hg; *V. gloicephalus* acumula As y *L. pubescens* Se. Si comparamos los datos de acumulación de las especies comunes de Nitrastur y El Terronal, vemos que *A. muscaria* presenta unos niveles de acumulación de Ni, Pb y Cd similares en ambos emplazamientos, siendo el resto de metales, excepto el Se, muy superiores en los ejemplares encontrados en El Terronal. Para *L. pubescens* se dan niveles similares de Ni, Zn, Cd y Pb, con respecto a la muestra obtenida en Nitrastur, destacando la no detección de Cu en ninguna de las muestras de ambos emplazamientos, y el alto contenido en Se de las de Nitrastur comparado con la práctica ausencia en las muestras de El Terronal. Por último si comparamos las muestras de *I. dulcamara* se observa una alta

variabilidad entre emplazamientos, así como dentro de un mismo emplazamiento, para el Cu, Se, Cd y Zn. Todos estos resultados ponen de manifiesto la alta variabilidad existente en el contenido de metales de un cuerpo fructífero en una misma especie e incluso dentro de un mismo emplazamiento. Según Gadd (2007), este hecho se debe no solo a las características intrínsecas del organismo, sino a factores ambientales que parecen ser cruciales para la acumulación de metales por los Macromycetes, y que incluyen las propiedades físico-químicas del suelo como son la humedad y la temperatura, así como todos aquellos que afectan a la disponibilidad del metal, o a la actividad fisiológica del hongo.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante XRF, seleccionamos 6 muestras, para analizar mediante ICP-MS. La selección de las muestras se realizó no solo en base al contenido de metales encontrados en las setas, sino a su porte, facilidad de cultivo y bibliografía disponible sobre ellas. De esta manera seleccionamos *A. muscaria* (Terronal), *L. scabrum* (Nitrastur), *P. cuprinus* secado a 35 °C y a 70 °C (Nitrastur), *V. gloiocephalus* (Olicio) y *P. involutus* como muestra control.

Como muestran los resultados de Tabla 3.8., lo primero que comprobamos, es que independiente de la especie de hongo, los niveles de Pb bajan significativamente, solo superando los límites propuestos por Kalač (2010) las 3 muestras procedentes de Nitrastur. Estos datos, por tanto, nos confirman que el XRF estaba realizando una sobrestimación de este metal. Si comparamos los niveles de la especie control *P. involutus* con los límites normales, vemos que solamente el Zn los excede, aunque se encuentra muy cerca del nivel máximo. Esta especie se ha descrito que posee una alta tolerancia (Denny y Wilkins, 1987) y capacidad de absorción por la superficie de las hifas (Colpaert y van Assche, 1992) de este metal.

Si observamos los resultados obtenidos en *A. muscaria*, ésta excede los niveles para Zn, As, Se, Cd y Hg. Si comparamos estos resultados con los obtenidos mediante XRF, los resultados son bastante similares para el Zn, Cu, Se y Cd aunque con variaciones. Sin embargo mediante XRF no se había detectado la presencia de As, que ha resultado ser de 12,97 mg Kg⁻¹ mediante ICP-MS. No solo esta especie, sino el género *Amanita* ha sido descrito como acumulador de As. En concreto Kuehnelt *et al.* (1997) llegaron a detectar niveles de 21,9 mg Kg⁻¹, en suelos contaminados en Austria. En cuanto a los niveles de Hg observados, estos descienden bruscamente de los 333 mg Kg⁻¹ obtenidos mediante XRF a los 119,58 mg Kg⁻¹ mediante ICP-MS. Aun así estos niveles de acumulación son muy elevados y exceden niveles alcanzados por otras especies como *Agaricus bisporus* (Byrne y Tusek-Znidaric, 1990) con 75 mg Kg⁻¹, o los 100 mg Kg⁻¹, que encuentran Mejstrik y Lepsova (1993) en diferentes especies, por lo que nos podemos encontrar ante una cepa o ecotipo hiperacumulador.

En cuanto a *L. scabrum*, vemos que los resultados obtenidos mediante ICP-MS, exceden los límites para As, Se y Pb. Si comparamos estos datos con los resultados obtenidos mediante XRF, vemos de nuevo que no se había detectado As cuando el ICP-MS detecta 11,31 mg Kg⁻¹, obteniendo además niveles superiores mediante esta metodología para el Cu y Hg, e inferiores para el Zn, Se, Cd y Pb. Sobre esta especie existe abundante bibliografía debido a que es consumida en países asiáticos y de Europa del Este, y existen numerosos artículos sobre la acumulación de metales de esta especie en zonas no contaminadas. Por esta razón podemos decir que el *L. scabrum* de Nitrastur acumula Cd, Fe, Hg, Pb y Se, si tenemos en cuenta los datos aportados por Falandysk *et al.* (2007). La República Checa es el único país que dispone de legislación sobre el contenido de metales permitido en setas silvestres, superando esta especie los niveles de Pb (10 mg Kg⁻¹), Cd (2 mg Kg⁻¹), As (3 mg Kg⁻¹), Fe (80 mg Kg⁻¹) y Zn (80 mg Kg⁻¹), y por tanto no sería apta para su consumo.

En el caso de las mediciones obtenidas para *P. cuprinus*, el primer dato reseñable, es que si comparamos las mediciones obtenidas a diferentes temperaturas de secado (35 °C-70 °C) de ejemplares recogidos en un mismo punto, vemos una clara diferencia siendo el Fe, Mn, Cu, Zn, As y Pb superiores en las secadas a 35 °C que las secadas a 70 °C. Este hecho refrenda los resultados obtenidos mediante XRF, y además siendo superiores los niveles obtenidos con ICP-MS para los metales Cu, As, Se y Hg, que mediante XRF. Con estos datos, para asegurarnos de que las diferencias observadas no eran producto de un error en el sistema de medida y poder hacer un análisis estadístico de los mismos, enviamos tres réplicas de cada muestra que se analizaron por duplicado en las que se midieron el Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg y el Pb. Los resultados tal como se muestran en la Tabla 3.10., determinan que existen diferencias significativas para todos los metales medidos. Para el caso del Hg, Se y Cd, se observan unas variaciones mínimas aunque significativas, por ello consideramos que estas diferencias pueden ser achacadas al origen de la muestra, ya que éstas fueron recogidas con una semana de diferencia. Sin embargo las diferencias observadas en Cu, Zn, As y Hg son muy elevadas por lo que consideramos que la temperatura parece clave en la disminución de su contenido en la muestra. Para comprobar este hecho y desechar la posibilidad de que las diferencias solo pudieran ser achacadas al origen, la muestra previamente secada a 35 °C se rehidrató, se separó en dos mitades, resecando una mitad a 35 °C y la otra a 70 °C durante 48 horas. Los resultados (Tabla 3.11.), muestran una bajada de todos los metales en la muestra secada a 70 °C con respecto a la de 35 °C. Para algunos metales como el Cd o Se es prácticamente despreciable por lo que podríamos considerar que no sufren una variación. Sin embargo para el caso del As, Hg, Zn, Cu y Pb la bajada es muy elevada, pudiendo ser debida a los diferentes sistemas de movilización que presentan los hongos.

La biometilación y la reducción de metales está descrita para un amplio número de bacterias y hongos para metales como el Hg, As, Se, Sn, Te y Pb (Gadd, 2004). La bajada del Hg por tanto se puede explicar ya que muchos hongos son capaces de reducir el Hg (II) a Hg (0) volátil (Gadd, 1993), siendo además frecuente que un porcentaje del Hg acumulado este en forma de metilmercurio (Kalač y Svodoba, 2000). En el caso del As se ha visto que las formas presentes en cuerpos fructíferos son el ácido dimetilarsénico o la trimetilarsina, nunca detectándose el arsenito ni el arseniato (González *et al.*, 2009). Por todo ello podemos deducir que una posible causa de la bajada de estos elementos sea por la formación de compuestos orgánicos o inorgánicos capaces de volatilizarse a 70 °C. Y no solo eso sino que además en la zona sabemos que existen vertidos de hidrocarburos, así como posiblemente restos de fertilizantes y toda clase de rellenos antrópicos, así que conociendo la alta capacidad de catabolizar contaminantes orgánicos y organometales que poseen los hongos, puede estar teniendo lugar no solo la formación de compuestos volátiles sino la absorción del medio de compuestos como el trimetilo o tetraetilo de Pb. Vistos estos datos será necesario profundizar en el estudio de los posibles intermediarios volátiles y en los mecanismos de movilización e inmovilización presentes en cada especie. Adicionalmente parece claro que para futuros estudios se deberían utilizar bajas temperaturas de secado de las muestras fúngicas, ya que con el secado a altas temperaturas de las muestras se estaría subestimando la capacidad de acumulación, y su potencial toxicidad en el caso de las especies comestibles.

Con respecto a los niveles de acumulación de *P. cuprinus* no existe ningún resultado con el que comparar nuestros datos ya que se trata de una especie recientemente descrita (Jargeat *et al.*, 2014). Aún así, numerosos trabajos del genero *Paxillus* indican su elevada capacidad de acumular diferentes metales como el Zn (Tuszynska *et al.*, 2005) y el Pb (Marschner *et al.*, 1996), así como su potencial uso en programas de fitoestabilización o fitorremediación (Fernández *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran, especialmente los de los ejemplares secados a 35 °C, que estaríamos ante una especie hiperacumuladora de Fe y acumuladora de As y Pb.

Por último los resultados observados para *Volvopluteus gloiocephalus* (syn. *Volvariella speciosa*), muestran que excede los niveles de Fe y As. Si comparamos estos resultados con los datos obtenidos mediante XRF, vemos una sobrestimación del Cd, Zn, Pb y una subestimación del Cu, As y Hg, por parte del XRF. Esta especie se ha descrito como hiperacumuladora de Fe alcanzando niveles de 6990 mg Kg^{-1} , encontrados en ejemplares próximos a una carretera en Turquía (İşiloğlu *et al.*, 2001). Así mismo podemos considerarla como acumuladora de As, aunque sin superar los elevados niveles que es capaz de acumular *Laccaria amethystina* (1420 mg Kg^{-1}) (Larsen *et al.*, 1998). Adicionalmente como el caso del *L. scabrum*, esta especie es consumida en diferentes países, y si la comparamos con la legislación existente en la República Checa, este ejemplar excedería los niveles permitidos de Fe, Zn y As.

A la vista de todos estos resultados decidimos hacer una comparativa entre los resultados de ICP-MS y XRF obviando la especie y centrándonos en el metal, para saber los diferentes que eran los datos (distancia), la correlación existente entre ellos y determinar la ecuación de la recta. Los resultados tal como se muestra en la Tabla 3.9., determinan que el Se y el Cd son los metales que presentan los valores más parecidos para ambas técnicas, siendo el Pb el metal para el que más difieren. Así mismo observamos una correlación moderada para el Zn, y alta para el resto de metales estudiados, siendo la correlación significativa al 0,05 para el Cu y el Cd y al 0,01 para el Se, Hg y Pb. Viendo el global de los datos se aprecia una subestimación por el XRF del Cu, As y Se, y una sobreestimación para el Cd y el Pb. Para el caso del Pb, en concreto se ve que esa sobreestimación es siempre alrededor de 80 mg Kg^{-1} , por lo que parece que hay un problema en la calibración del aparato. Para el caso del Hg aunque la correlación existente sea de 1, los valores difieren entre ellos mucho (solo una especie acumuló) y entre las técnicas. La bajada en los niveles de Hg en ICP-MS podría deberse al procesamiento necesario para su análisis, ya que como se ha mencionado anteriormente el Hg es un elemento inestable y volátil. Por todo ello se deberían analizar un mayor número de muestras en una especie que sepamos que es acumuladora para confirmar la existencia de esta correlación tan fuerte. Con todo ello podemos concluir que aunque asumimos como más precisos los resultados del ICP-MS, podríamos considerar como validos los datos para el Se, Zn, Cu o Cd obtenidos mediante XRF. Parece que el problema en la medición de los metales del XRF pudiera ser debido a la precisión en la calibración, ya que mientras variaciones de 5 mg Kg^{-1} en un análisis de un suelo contaminado parecen no ser relevantes, cuando hablamos de organismos que acumulan poca cantidad estas variaciones parecen ser cruciales. Lo que sí parece claro es que la utilización del XRF como herramienta previa, para una primer análisis de las muestras ha resultado muy útil, pudiendo discriminar las muestras con algún tipo de contaminación para un posterior análisis en ICP-MS.

3.5. Bibliografía

- Adriaensen, K., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V. (2006). Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza*. 16: 553-558.
- Alonso, J., Garcia, M.A., Perez-Lopez, M., Melgar, M.J. (2003). The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Arch Environ Contam Toxicol*. 44:180-188.
- Andrés, J., Llamas, B., Terrón, A., Sánchez, J.A., Prieto, O.G., Arrojo, E., Jarauta, T.P. (Eds.) (1992). *Guía de hongos de la península ibérica*. Celaralyn Editorial.
- Bakken, L.R., y Olsen, R.A. (1990). Accumulation of radiocaesium in fungi. *Can J Microbiol*. 36:704-710.
- Baldrian, P. (2003). Interaction of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol*. 32: 78-91.
- Beckhoff, B., Kanngießler, B., Langhoff, N., Wedell, R., Wolff, H. (Eds.) (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Borovička, J., Kotrba, P., Gryndler, M., Mihaljevič, M., Řanda, Z., Rohovec, J., Cajthaml, T., Stijve, T., Dunn, C.E. (2010). Bioaccumulation of silver in ectomycorrhizal and saprobic macrofungi from pristine and polluted areas. *Sci Total Environ*. 408:2733-2744.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Groveg, T., Malajczuck, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. ACIAR Monograph 32.
- Brunner, I., Frey, B., Riesen, T.K. (1996). Influence of ectomycorrhization and cesium/potassium ratio on uptake and localization of cesium in Norway spruce seedlings. *Tree Physiol*. 16: 705-711.
- Byrne, A.R., Tusek-Znidaric, M. (1990). Studies of the uptake and binding of trace metals in fungi, Part I: Accumulation and characterization of mercury and silver in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Organomet Chem*. 4:43-48.
- Campos, J.A., Tejera, N.A., Sánchez, C.J. (2009). Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals*. 22:835-841.
- Chang, S.T. y Chan, K.Y. (1973). Quantitative and qualitative changes in proteins during morphogenesis of the basidiocarp of *Volvariella volvacea*. *Mycologia*. 65:355-364.
- Copaert, J.V. y van Assche, J.A. (1987). Heavy metal resistance in some ectomycorrhizal fungi. *Funct Ecol*. 1:415-421.
- Copaert, J.V. y van Assche, J.A. (1992). Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant soil*. 143:201-211.

- Copaert, J.V., Vandenkoornhuysse, P., Adriansensen, K., Vangronsveld, J. (2000). Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol.* 147: 367-379.
- Danesh, Y.R., Tajbakhsh, M., Goltapeh, E.M., Varma, A. (2013). Mycoremediation of Heavy Metals. En: *Fungi as Bioremediators*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 245-267.
- Denny, H.J., Wilkins, D.A. (1987). Zinc tolerance in *Betula ssp.* IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytol.* 106:545-553.
- Duñabeitia, M.K., Hormilla, S., García-Plazaola, J.I., Txarterina, K., Arteche, U., Becerril, J.M. (2004). Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza.* 14: 11-18.
- Falandysz, J., Kunito, T., Kubota, R., Bielawski, L., Mazur, A., Falandysz, J.J., Tanabe, S. (2007). Selected elements in brown birch scaber stalk *Leccinum scabrum*. *J Environ Sci Health [A].* 42: 2081-2088.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., Tamés, R.S. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environ Pollut.* 152:522-529.
- Frey, B., Brunner, I., Walther, P., Scheidegger, C., Zierold, K. (1997). Element localization in ultrathin cryosections of high-pressure frozen ectomycorrhizal spruce roots. *Plant Cell Environ.* 20:929-937.
- Gadd, G.M. (1993a). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124:25-60.
- Gadd, G.M. (1993b). Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 11:297-316.
- Gadd, G.M. (2004). Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist.* 18:60-70.
- Gadd GM, (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 3:3-49.
- García, M.A., Alonso, J., Melgar, M.J. (2009). Lead in edible mushrooms Levels and bioaccumulation factor. *J Hazard Mater.* 167:777-783.
- González, A., Llorens, A., Cervera, ML, Armenta, S., de la Guardia, M. (2009). Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hybrid generation atomic fluorescence spectrometry. *Food Chem.* 115: 360:364.
- Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Volkmann, M. (2002). Rock surfaces as life indicators: new ways to demonstrate life and traces of former life. *Astrobiology.* 2:203-213.
- Harms, H., Schlosser, D., Wick, L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol.* 9:177-192.

- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M.J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:12002–12006.
- Hibbett, D.S. y Thorn, R.G. (2001). Basidiomycota: homobasidiomycetes. En: *Systematics and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 121-168.
- Işiloğlu, M., Yılmaz, F., Merdivan, M. (2001). Concentrations of trace elements in wild edible mushrooms. *Food Chem*. 73:169-175.
- Jargeat, P., Chaumeton, P-M., Navaud, O., Vizzini, A., Gryta, H. (2014). The *Paxillus involutus* (*Boletales, Paxillaceae*) complex in Europe: Genetic diversity and morphological description of the new species *Paxillus cuprinus*, typification of *P. involutus* s.s., and synthesis of species boundaries. *Fungal Biol*. 118:12-31.
- Jentschke, G. y Godbold, D.L. (2000). Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol Plant*. Vol. 109. 2: 107-116.
- Kalač, P. (2010). Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009. *Food Chem*. 122:2-15.
- Kalač, P. y Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem* . 69:273-281.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, R., Cullimore D. (1999). Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol*. 70:95-104.
- Kuehnelt, D., Goessler, W., Irgolic, K.J. (1997). Arsenic compounds in terrestrial organisms I: *Collybia maculata*, *Collybia butyracea* and *Amanita muscaria* from arsenic smelter sites in Austria. *Appl Organomet Chem*. 11:289-296.
- Larsen, E.H., Hansen, M., Gössler, W. (1998). Speciation and health risk consideration of arsenic in the edible mushroom *Laccaria amethystina* collected from contaminated locations. *Appl Organomet Chem*. 12:285-291.
- Lodge, D.J., Ammirati, J.F., O'Dell, T.E., Mueller, G.M. (2004). Collecting and describing Macrofungi. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (Eds.). *Biodiversity of fungi*. Elsevier, Inc. Academic Press, San Diego, pp. 128-158.
- Matheny, P.B. *et al.* (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia*. 98:982-995.
- Marschner, P., Godbold, D.L., Jentschke, G. (1996). Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Soil*. 178: 239-245.
- Meharg, A.A. y Cairney, J.W.G. (2000). Ectomycorrhizas: extending the capabilities of rhizosphere remediation?. *Soil Biol Biochem* 32:1475-1484.
- Mejstrik, V. y Lepsova, A. (1993). Applicability of fungi to the monitoring of environmental pollution by heavy metals. En: Market, B. (Ed). *Plants as Biomonitors*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim pp. 365-378.

- Michelot, D., Sibobud, E., Doré, J.-C., Viel, C., Poirier F. (1998). Update on metal content profiles in mushrooms-Toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. *Toxicon*. 36: 1997-2012.
- Montaser, A. (1998). *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Wiley-VCH, New York.
- Riesen, T.K., Brunner, I. (1996). Effect of ectomycorrhizae and ammonium on ^{134}Cs and ^{85}Sr uptake into *Picea abies* seedlings. *Environ Pollut*. 93:1-8.
- Sterflinger, K. (2000). Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J*. 17: 97-124.
- Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G.(2001). Arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *New Phytol*. 151:265-270.
- Shumate, S.E., Strandberg, G.W. (1985). Accumulation of metals by microbial cells. En: Moo Young, M., Robinson, C.N., Howell, J.A. (Eds.). *Comprehensive Biotechnology*, vol. 4, Pergamon Press, New York. pp. 235.
- Singer, R. (1986). *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, vol. 981.
- Stijve, T., Diserens, H., Oberson, J.M., Meijer, A.A.R. (1998). The natural inorganic bromide content of edible mushrooms. *Deut Lebensm-Rundsch*. 94:112-117.
- Tarvainen, O., Markkola, A. M., Strömmer, R. (2003). Diversity of macrofungi and plants in Scots pine forests along an urban pollution gradient. *Basic and Appl Ecol*. 4:547-556.
- Tuszynska, S., Davies, D., Turnau, K., Ashford, AE. (2006). Changes in vacuolar and mitochondrial mobility and tubularity in response to zinc in a *Paxillus involutus* isolate from a zinc-rich soil. *Fungal Genet Biol*. 43:155-163.



CAPÍTULO 4

DIVERSIDAD FÚNGICA DE LAS RAÍCES Y RIZOSFERA DE ESPECIES FORESTALES EN ZONAS ALTAMENTE CONTAMINADAS

4.1. Introducción

Originariamente, los estudios sobre las comunidades de hongos ectomicorrícicos se basaban en el muestreo de esporocarpos. Sin embargo, este método no da una información completa del total de especies y de su importancia en el ecosistema, ya que la presencia de cuerpos fructíferos depende de varios factores edáfico-climáticos y del desarrollo del hongo y de la planta asociada, por lo que es posible que algunos hongos ectomicorrícicos no se detecten incluso durante años, aunque estén presentes en la rizosfera.

Un avance en el análisis de estas comunidades fue el estudio de los morfotipos, que consiste en la descripción detallada de las características morfológicas, anatómicas y citológicas de las distintas micorrizas (Agerer, 2001; Kranabetter y Friesen, 2002). Sin embargo, pueden existir grandes similitudes físicas entre morfotipos causados por diferentes hongos o grandes variaciones entre un mismo hongo y distintos huéspedes. Esta variación se debe no solo al tipo de planta y hongo, sino a diversos factores como la edad o condiciones ambientales (Egger, 1995), siendo difícil o incluso imposible establecer una identificación fiable. Aun con esto, la morfotipificación constituye una herramienta valiosa para la identificación y separación de las diferentes comunidades fúngicas presentes en un mismo ecosistema e incluso dentro de un solo hospedador.

Actualmente la identificación del hongo presente en la micorriza se está resolviendo por medio de técnicas de biología molecular, en concreto mediante el análisis de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico. El ITS aparece en unidades repetidas adyacentes (Débaud *et al.*, 1999) y contiene dos regiones no codificantes altamente variables (ITS1 y ITS2), separadas por el gen 5.8S, región altamente conservada y que codificada el ARN estructural de la subunidad pequeña del ribosoma (Gardes y Bruns, 1993). Por lo tanto, las regiones ITS tienen una alta variación interespecífica y baja intraespecífica, lo que las hace muy apropiadas para la determinación de especies o categorías taxonómicas superiores.

Adicionalmente, a través del estudio de raíces y rizosfera de planta forestal, se ha podido confirmar la presencia de otros tipos de asociaciones fúngicas, como es el caso de las micorrizas arbusculares (AM). Este tipo de asociaciones se encuentran en el 80% de todas las familias de plantas vasculares (Brundrett, 1991; Wang y Qiu, 2006), apareciendo en ecosistemas naturales y en zonas degradadas y contaminadas (Jeffries *et al.*, 2003), mejorando la nutrición, tolerancia y acumulación de metales pesados por parte de la planta (Tonin *et al.*, 2001). Estos hongos son considerados biotrofos estrictos incapaces de crecer y completar su ciclo de vida sin estar asociados a raíces vivas (Smith y Read, 2008). Una vez establecida la asociación, el hongo desarrolla diferentes estructuras somáticas (arbusculos, vesículas, células auxiliares y micelio) (Stürmer, 2012) y esporas asexuales que contienen características morfológicas utilizadas para la separación e identificación de especies (Morton, 1990), siendo por tanto la obtención de esporas primordial tanto para la determinación taxonómica (morfológica y molecular) de las especies, como para su posterior utilización como inóculo.

En los últimos años no solo han tomado importancia el estudio de las micorrizas mencionadas anteriormente, sino que se ha observado la presencia de los denominados endófitos septados oscuros (DSE), especialmente en zonas degradadas (Vrålstad *et al.*, 2002). Se definen como un grupo muy heterogéneo de Ascomycetes (excluyendo los *Clavicipitaceae*) (Mayerhofer *et al.*, 2013) que se caracterizan por presentar un micelio septado y melanizado, con un desarrollo intra e intercelular (Jumpponen y Trappe, 1998), llegando incluso a generar manto y red de Hartig (O'Dell *et al.*, 1993), produciendo unas estructuras típicas intracelulares denominadas microesclerocios, todo ello sin causar daños aparentes a la planta. El papel que

juegan estos hongos sobre la planta huésped es controvertido ya que mientras que existen autores que observan su actuación como promotor de fitohormonas (Schulz, 2006) y efectos positivos, como lo haría una micorriza (Jumpponen, 2001; Newsham, 2011), otros observan efectos negativos (Wilcox y Wang, 1987; Tellenbach *et al.*, 2011).

Por todo, el objetivo de esta parte del trabajo fue profundizar en el estudio de la diversidad de las comunidades fúngicas existentes en las raíces y la rizosfera de plantas forestales (*Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra*) de una zona altamente contaminada con metales pesados (Nitrastur), para determinar posibles especies candidatas en futuros programas de repoblación.

4.2. Material y Métodos

4.2.1. Muestreo

Basándonos en los datos obtenidos del análisis del suelo (Capítulo 2, Tabla 2.2.), seleccionamos aquellas cuadrículas que mayor contaminación presentaban, y dentro de ellas individuos juveniles de no más de 3 metros de altura y relativamente aislados para una correcta localización de las raíces. La ubicación de los individuos seleccionados se muestra en la figura 4.1.



Fig.4.1.: Ubicación de los ejemplares estudiados dentro de la parcela seleccionada. Para la elaboración del mapa se ha utilizado la cartografía y ortofotos PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

En cada ejemplar se desenterraron cuidadosamente las raíces, asegurándonos de que partían del árbol seleccionado, y escogiendo aquellas con mayor número de raíces laterales. Una vez cortadas se introdujeron en una bolsa estéril con cierre zip, y se sacudieron las raíces para recolectar la rizosfera. Posteriormente las raíces se almacenaron en otra bolsa estéril, etiquetando ambas muestras con la especie y la cuadrícula.

4.2.2. Descripción macro-microscópica y recogida de muestras

Para realizar una correcta identificación de los hongos presentes en cada ejemplar, las raíces se lavaron cuidadosamente por separado y en bandejas individuales. Posteriormente pequeñas porciones fueron transferidas a una nueva bandeja con agua limpia sobre la que se procedió a su observación y fotografiado utilizando una lupa Nikon modelo SMZ-U y una cámara fotográfica Nikon modelo F-601M. La descripción macroscópica de los diferentes morfotipos de ectomicorrizas encontrados se realizó mediante fichas identificativas (Apéndice 2), elaboradas en base a la metodológica indicada por Agerer (1990) y Goodman *et al.* (1996). Para cada morfotipo se realizaron 25 mediciones de sus dimensiones (longitud del sistema y de la punta, ancho de la punta, eje mayor y base). En aquellos casos en los que se encontraron raíces blancas con micelio adherido, éstas se recogieron para intentar determinar la posible presencia de endomicorrizas u otros endófitos. Cada morfotipo (40 puntas) o raíz con micelio se recogió individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml, fijando una mitad en FAA (180 ml etanol, 10 ml de formol y 10 ml de ácido acético) para su posterior observación microscópica, y congelando la otra mitad a -80 °C hasta el momento de realizar los análisis moleculares.

Para la descripción microscópica de los diferentes morfotipos encontrados se realizaron cortes de entre 10-30 μm de espesor con un criostato Leica modelo CM1510-1, y su caracterización histológica se realizó mediante fichas (Apéndice 3) elaboradas basándose en la metodológica indicada por Goodman *et al.* (1996) e Ingleby *et al.* (1990). Parte de estos cortes se tiñeron colocándolos directamente sobre una gota de lactofenol azul de algodón (0,05 g de azul de algodón, 25 ml ácido láctico, 25 ml glicerina y 25 ml H_2O) sobre un portaobjetos, y otra parte dejándolos en azul de toluidina al 0,2% durante 20 minutos, para posteriormente lavarlos con lactoglicerol (100 ml de ácido láctico, 100 ml de glicerina y 100 ml de H_2O). Para la observación microscópica de estos últimos, los cortes se montaron con lactoglicerol. Se realizaron 25 medidas de cada una de las capas del manto observadas.

Para determinar la presencia de endomicorrizas, éstas fueron clarificadas y posteriormente teñidas siguiendo la metodología de Kormanik y McGraw (1982). Para ello primero se lavaron con abundante agua corriente y luego se colocaron en KOH al 10% a 100 °C durante 10-15 minutos. Se volvieron a lavar con agua corriente y posteriormente se colocaron en HCl 1 N durante 10 minutos. Tras decantar el HCl y sin lavar las raíces se adicionó azul de tripan al 0,05%, y se dejaron 10 minutos a 100 °C. Finalmente se retiró el colorante y se lavaron las raíces en lactoglicerol. Para detectar la presencia de endófitos hialinos en las raíces se utilizó una modificación de la tinción de lípidos utilizada por Barrow y Aaltonen (2001), en la que se realiza el mismo proceso de clarificación descrito anteriormente sustituyendo el azul de tripan por Sudan Black B (0,3 g Sudan Black B, 74 ml de etanol al 95% y 24 ml de dH_2O), y posteriormente almacenadas en glicerol ácido (500 ml glicerol, 450 ml de H_2O y 50 ml de HCl). En ambos casos, se observaron unas 10 raíces de 1 o 2 cm montadas con lactoglicerol sobre portaobjetos.

Tanto los cortes como las raíces clarificadas se estudiaron con microscopio Nikon modelo Optiphot con sistema de contraste diferencial de Normarski y cámara fotográfica Nikon modelo F-601M.

4.2.3. Extracción de ADN genómico de ectomicorrizas.

Para la extracción del ADN genómico, se homogeneizaron unas 20 puntas de cada uno de los morfotipos encontrado, con ayuda del homogeneizador Silamat® S6. El ADN se extrajo mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante.

La cantidad y calidad de ADN genómico extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio) empleando un sistema Gel Logic 100 (KODAK) y el programa informático KODAK 1D Image Analysis.

4.2.4. Amplificación y análisis de regiones ITS

Para la identificación de las especies ectomicorrícicas de los diferentes morfotipos, se amplificó la región ITS constituida por ITS 1, ITS 2 y el 5.8S rRNA utilizando las parejas de cebadores ITS 1 e ITS 4 (Tabla 4.1.).

Tabla 4.1.: Cebadores utilizados en la amplificación de la región ITS mediante PCR, con sus respectivas secuencias de bases y la procedencia de los mismos. F y R indican los cebadores *forward* y *reverse* respectivamente.

Región	Cebador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS 1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS 4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Las amplificaciones se realizaron en reacciones de 25 µL de volumen final con 10 ng de ADN, 2,5 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 1 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,5 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,5 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,1 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 40 s, anillamiento a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1,50 min durante 30 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min. En aquellas muestras en la que no se logró la amplificación de banda se realizó una Re-PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente con 2 µl del producto anterior. En el caso de no conseguir ningún tipo de amplificación con el protocolo anterior de PCR, se utilizó el descrito por Hedh *et al.* (2008). Las amplificaciones en este protocolo se realizaron en reacciones de 20 µL de volumen final con 10 ng de ADN, 2 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,4 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,4 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,08 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 7 min, seguido de una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillamiento a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2,30 min durante 35 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min. En caso de no obtener la amplificación se realizó una Re-PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Si como producto de las amplificaciones se obtenía solo una banda, se llevaba a cabo una purificación del producto de PCR resultante, mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up de Macherey-Nagel siguiendo el protocolo del fabricante. En el caso de obtener más de una banda, cada una era purificada mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up siguiendo el protocolo del fabricante. Adicionalmente, ante la sospecha de la presencia de varios organismos, estas secuencias fueron sometidas a un proceso de digestión con las endonucleasas Eco-RI (Sigma), Hae III (Invitrogen) y Hinf II (Takara), seleccionando las que mayor cantidad de ADN presentaban y purificándolas de la misma manera.

La secuenciación de las regiones amplificadas se llevó a cabo a través de un servicio externo, Stab Vida, utilizando los mismos cebadores usados en la amplificación y bajo condiciones de terminación BigDye™. Posteriormente la lectura se realizó en un secuenciador automático ABI 3730 XL y utilizando el sistema LongTrac, también a través de la misma empresa. Las secuencias *forward* y *reverse*, o los fragmentos obtenidos tras el corte con las endonucleasas de cada morfotipo fueron analizadas, corregidas las indeterminaciones y alineadas mediante el programa Geneious Pro 4.8.2., generando una secuencia consenso de mayor calidad. Las ambigüedades presentes en las secuencias fueron sustituidas por los

símbolos del código internacional de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Por último, con las secuencias consenso se hizo un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para determinar la posible especie, aunque ésta se determinará con más precisión mediante el análisis filogenético de las secuencias en el Capítulo 5.

4.2.5. Generación de esporas y determinación taxonómica

Una vez comprobada la existencia de endomicorrizas en *Betula* (B-F3), *Populus* (P-C1) y *Salix* (S-D2), se utilizó la rizosfera recolectada de estos individuos para generar un semillero de *Allium ampeloprasum* (puerro) e intentar generar esporas y conseguir determinar las especies endomicorrízicas presentes en el área.

Para ello utilizamos 40 semillas que se lavaron con H₂O destilada, posteriormente se dejaron en H₂O₂ al 3% durante 5 minutos, y por último se volvieron a lavar con H₂O destilada estéril. Para su germinación, éstas se colocaron en una placa de Petri con vermiculita en el fondo y un par de papeles de filtro bien humedecidos sobre los que se colocaron las semillas a temperatura ambiente. El sustrato del semillero se preparó a partir de la rizosfera de cada individuo a la que se adicionó perlita (v/v 1:1) para mejorar la aireación. En cada caso el sustrato se colocaba en un tiesto cerrado y sobre una bandeja individual, para conservar la diversidad existente en cada ejemplar. A los 10 días, se transfirieron 10 semillas germinadas a cada tiesto y se dejaron crecer durante 2 meses, realizando una fertilización quincenal con Peters® 1 g/l (20-7-19). Tras este período se recogieron muestras de raíces para comprobar si éstas estaban infectadas y realizar una descripción de las endomicorrizas encontradas. Para ello se realizó la clarificación y tinción con azul de tripán descrita anteriormente. Una vez comprobada la infección se dividió la muestra: una parte para el mantenimiento de las endomicorrizas y otra que fue sometida a un periodo de estrés hídrico durante 1 mes para forzar la generación de esporas. Tras este período el sustrato se recogió en bolsa estériles individuales y se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento.

Para la separación de las esporas del sustrato seguimos una mezcla de las técnicas de Gerdermann y Nicolson (1963) y Tommerup (1992). En primer lugar el sustrato se pasó por un tamiz de 2 mm de luz de malla, para eliminar rocas y escombros. Posteriormente se dividió la muestra total en sub-muestras de 50 g (3 en P-C1, 7 en B-F3 y 7 en S-D2) que se suspendieron cada una de ellas, en 2 litros de agua y se homogeneizaron en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se dejó reposar unos segundos para que las partículas más pesadas sedimentaran y se decantó a través de una cadena de tamices de 500, 250, 125 y 50 µm de luz de malla (Fig.4.2.). Este proceso se repitió hasta que el agua resultante del paso por los tamices salía limpia. Tras esto recogimos en tubos falcon® de 50 ml el sedimento depositado en los tamices de 250, 125 y 50 µm, resuspendimos en H₂O y centrifugamos durante 5 minutos a 2000 rpm; descartando el sobrenadante para eliminar restos de materia orgánica (raíces, huevos, nemátodos, etc). Posteriormente resuspendimos el precipitado en una solución de sacarosa al 50% y centrifugamos 1 min a 2000 rpm para separar las esporas del resto del sustrato, descartando el precipitado y pasando inmediatamente el sobrenadante por un filtro de 50 µm para eliminar la sacarosa. Por último se filtran en vacío sobre papel de filtro (Whatman®), y se almacenan en placas Petri a 4 °C.

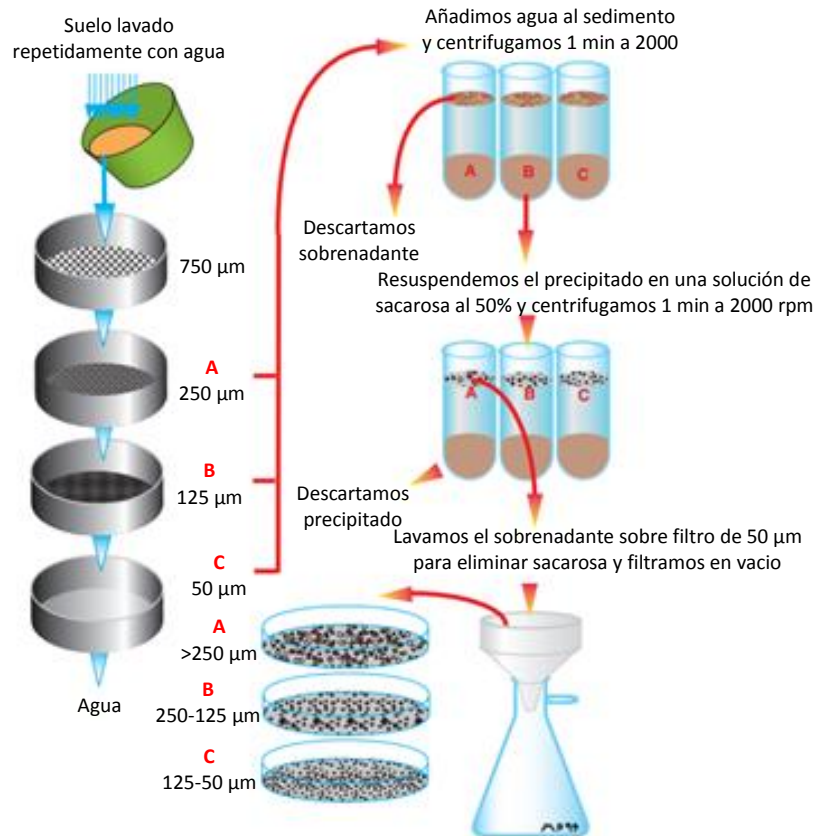


Fig.4.2.: Esquema de la separación de esporas del suelo. Ilustraciones basadas en libro *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture* (Brundrett et al. 1996).

Posteriormente las esporas se examinaron y fotografiaron utilizando una lupa Nikon modelo SMZ-U y una cámara fotográfica Nikon modelo F-601M. Una vez definidos los diferentes tipos de esporas se realizaron preparaciones semi-permanentes en PVLG (1,66 g de alcohol de polivinilo, 10 ml ácido láctico, 1 ml glicerina y 10 ml de H₂O destilada disuelto a 90 °C durante varias horas) sin y con (v/v 1:1) el reactivo de Melzer (100 ml hidrato de cloral, 1,5 g de 1,5 g KI y 100 ml H₂O destilada).

De acuerdo con la metodología de Morton (1988), las características microscópicas utilizadas para describir las esporas encontradas fueron: forma (globosa, subglobosa, ovoide, obovoide, elipsoide, piriforme, irregular, oblonga, reniforme, fusiforme, clavada, etc), tamaño, color, ornamentación, organización (aisladas, en grupos, en esporocarpos), desarrollo, germinación, contenido, hifa de sustentación, oclusión de la espora, grosor de la pared, estructura (murograma) y cambios de color en la reacción al reactivo de Melzer. Basándonos en la clasificación consenso propuesta por Redecker et al. (2013) y en la colección disponible en el INVAM (*International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi-West Virginia University*) se trató de identificar la especie.

4.3. Resultados

4.3.1. Muestreo

Se estudió el sistema radical de 5 árboles; 3 de *Betula celtiberica* (B-C1, B-D3 y B-F3), 1 de *Salix atrocinerea* (S-D2) y 1 de *Populus nigra* (P-C1) en los que se han identificado ectomicorrizas, endomicorrizas y endófitos septados oscuros (DSE).

4.3.2. Descripción e identificación de los diferentes morfotipos de ectomicorrizas

En las tres especies arbóreas se han identificado 4 morfotipos:

Betula celtiberica:

Morfotipo 1: Aparece en B-D3 (Fig.4.3.C) y B-C1. Ectomicorrizas monopodiales-pinnadas tendiendo a monopodiales-piramidales (Fig.4.3.B). Longitud del sistema $4,48 \pm 0,34$ mm, longitud de la punta $1,38 \pm 0,10$ mm, ancho de la punta $0,32 \pm 0,01$ mm, ancho del eje mayor $0,39 \pm 0,02$ mm, ancho de la base de la punta $0,32 \pm 0,01$ mm. Puntas derechas en las juveniles pasando a ser tortuosas (Fig.4.3.A). De color blanco mate, presentan una textura aterciopelada. Destaca la elevada cantidad de cordones miceliares y su distribución homogénea por todo el sistema radicular de la planta.



Fig.4.3.: A) Detalle de la punta, B) Aspecto macroscópico del Morfotipo 1, C) Apariencia de las micorrizas encontradas en campo.

Sin apenas hifas emergentes, las existentes son tortuosas y verrugosas, con una longitud media de $47,95 \pm 8,47 \mu\text{m}$ y con abundantes fíbulas (Fig.4.4.B). El manto presenta un espesor de $50,94 \pm 3,63 \mu\text{m}$, estructurado en 2 capas (Fig.4.4.A): una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red de unos $30,70 \pm 2,41 \mu\text{m}$ y una segunda de pseudoparénquima irregular de $19,03 \pm 1,38 \mu\text{m}$. Presentan una muy desarrollada red de Hartig que se extiende hasta la tercera capa de células corticales.

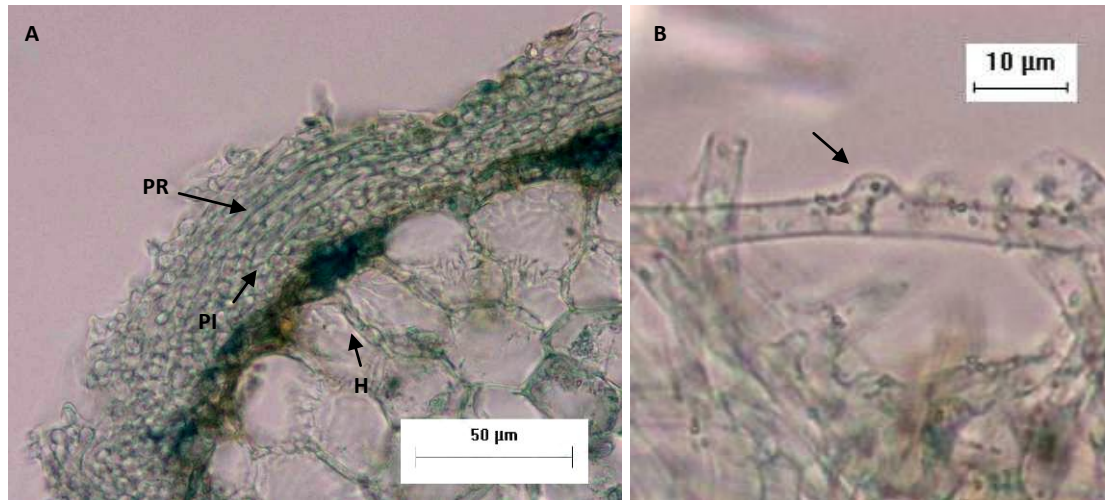


Fig.4.4.: Morfotipo 1. **A)** Corte transversal teñido con azul de algodón. H indica red de Hartig, PR indica pseudoparénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular, **B)** La flecha señala una de las fíbulas presentes en las hifas emergentes.

La secuencia de la región ITS obtenida (Fig.4.5.) de este morfotipo fue de 580 pb. Al realizar el BLAST, el resultado mostro una alta similitud (*Blast score* = 0.0; *Query coverage* = 100%) con secuencias de *Sclerotinia citrinum* (Secuencia ID: HM189957).

Query	1	CTCTAGGGAGGGGGAGGGGGAGAGTCCTCGCGT	SGCTCCT	TCGAACCTTTCCGAGGCTT	60
Sbjct	81	CTCTAGGGAGGGGGAGGGGGAGAGTCCTCGCGT	CGCTCCT	TCGAACCTTTCCGAGGCTT	139
Query	61	CATACCTCCCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTAGGGACCTATGTCTTCTCAGA			120
Sbjct	140	CATACCTCCCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTAGGGACCTATGTCTTCTCAGA			199
Query	121	ACTCGCATGTCTACAGAATGTCGTCCGTGGCCTCGGCCATCGTAAACCTAGTACAACCTTT			180
Sbjct	200	ACTCGCATGTCTACAGAATGTCGTCCGTGGCCTCGGCCATCGTAAACCTAGTACAACCTTT			259
Query	181	CAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAATCGCGATAAGTAAT			240
Sbjct	260	CAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAATCGCGATAAGTAAT			319
Query	241	GTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTCGGTA			300
Sbjct	320	GTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTCGGTA			379
Query	301	TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTATCGAAATATCAAATCGAAGCTTTTCGACCCCC			360
Sbjct	380	TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTATCGAAATATCAAATCGAAGCTTTTCGACCCCC			439
Query	361	GTCGGAGCTAGGTTTGGACCATGGGAGTCTGCGGGCGGGTCCCCTCCTGTGCGGAGGGGG			420
Sbjct	440	GTCGGAGCTAGGTTTGGACCATGGGAGTCTGCGGGCGGGTCCCCTCCTGTGCGGAGGGGG			499
Query	421	ACCTTCGGCTCTCCTCAAAGCATTAGCGGCGTGTGCGAGCCTCGCACGGCACGGCCTCT			480
Sbjct	500	ACCTTCGGCTCTCCTCAAAGCATTAGCGGCGTGTGCGAGCCTCGCACGGCACGGCCTCT			559
Query	481	TCGACGTCATAATGACCGTCGTGGGGCTGGAAGTGCCTGGGATCGCGTCGCTTTCCAAC			540
Sbjct	560	TCGACGTCATAATGACCGTCGTGGGGCTGGAAGTGCCTGGGATCGCGTCGCTTTCCAAC			617
Query	541	CTGCGAGCCCGTCTCGCAACGGGCCGCGGTCATCGATGT			580
Sbjct	618	CTGCGAGCCCGTCTCGCAACGGGCCGCGGTCATCGATGT			656

Fig.4.5.: Secuencia consenso (5' - 3') del Morfotipo 1 (Query) en negro, alineada con secuencia HM189957 de *S. citrinum* (Sbjct) rojo. Las diferencias entre las secuencias se remarcan.

Morfotipo 2: Presente en B-F3 (Fig.4.6.A). Ectomicorrizas monopodiales-pinnadas o no ramificadas en las juveniles (Fig.4.6.B). Longitud del sistema $2,68 \pm 0,59$ mm, longitud de la punta $1,43 \pm 0,22$ mm, ancho de la punta $0,10 \pm 0,01$ mm, ancho del eje mayor $0,12 \pm 0,01$ mm, ancho de la base de la punta $0,12 \pm 0,01$ mm. Puntas derechas tendiendo a dobladas o inclinadas, presentan una textura reticulada.



Fig.4.6.: A) Ejemplar de *B. celtiberica* del que se recolecto el Morfotipo 2, B) Aspecto macroscópico del Morfotipo 2.

Con pocas hifas emergentes, las existentes son tortuosas y sin ornamentación, con una longitud media de $71,03 \pm 16,52$ μm y sin fíbulas. El manto presenta un espesor de $37,17 \pm 1,99$ μm , estructurado en 2 capas: una primera capa de prosénquima en estructura de red, de unos $23,06 \pm 1,61$ μm y una segunda de pseudoparénquima irregular de $13,31 \pm 0,54$ μm . La red de Hartig (Fig.4.7.) se extiende entre la primera y segunda capa de células corticales.

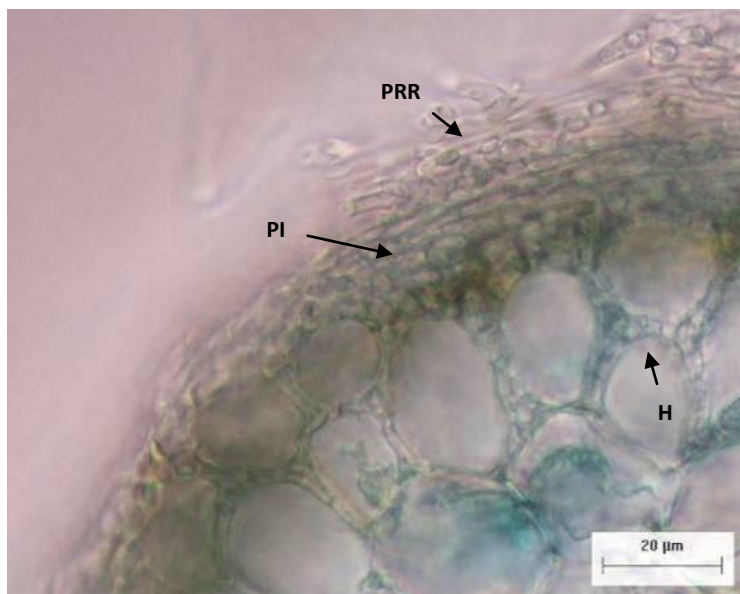


Fig.4.7.: Morfotipo 2. Corte transversal, teñido con azul de algodón. H indica red de Hartig, PRR indica prosénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular.

La secuencia consenso obtenida de la región ITS (Fig.4.8.) de este morfotipo fue de 408 pb. Al realizar el BLAST, el resultado mostró una alta similitud (*Blast score* = 0.0; *Query coverage* = 100%) con la secuencia de un ascomiceto del orden *Helotiales* (Secuencia ID:KC007304).

Query	1	CTCCACCCCTTTGTATACCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGTCGCAAGACCGGCGGCT	60
Sbjct	30	CTCCACCCCTTTGTATACCTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGTCGCAAGACCGGCGGCT	89
Query	61	TCGGCTGTCGTGTGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCTCTGAATACAGTGTCTGAGTACT	120
Sbjct	90	TCGGCTGTCGTGTGCCCGCCAGAGGACCCCAAACCTCTGAATACAGTGTCTGAGTACT	149
Query	121	ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	180
Sbjct	150	ATATAATAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA	209
Query	181	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATTCATCGAATCTTTGAACGC	240
Sbjct	210	GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATTCATCGAATCTTTGAACGC	269
Query	241	ACATTGCGCCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTCTTCCAGCGTCATTTACCCCTCAA	300
Sbjct	270	ACATTGCGCCCCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTCTTCCAGCGTCATTTACCCCTCAA	329
Query	301	GCTCTGCTTGGTTTTGGGCCGCGCCAGCAACGGCGGGCCTCGAAAATAGTGGCGACGCC	360
Sbjct	330	GCTCTGCTTGGTTTTGGGCCGCGCCAGCAACGGCGGGCCTCGAAAATAGTGGCGACGCC	389
Query	361	TCCGGCTCTCAGCGTAGTAATCTTCTCGCTGTGGGCCCCGGGTGGTT	408
Sbjct	390	TCCGGCTCTCAGCGTAGTAATCTTCTCGCTGTGGGCCCCGGGTGGTT	437

Fig.4.8.: Secuencia consenso (5'-3') del Morfotipo 2 (Query) en negro, alineada con secuencia KC007304 de un *Helotial* (Sbjct) rojo. Las diferencias entre las secuencias se remarcan.

Salix atrocinerea:

Morfotipo 3: Presente en S-D2 (Fig.4.9.C). Ectomicorrizas no ramificadas (Fig.4.9.A). Longitud de la micorriza $2,57 \pm 0,34$ mm, ancho de la punta $0,13 \pm 0,01$ mm, ancho de la base de la punta $0,14 \pm 0,01$ mm (Fig.4.9.B). Puntas derechas tendiendo a dobladas o inclinadas. De color marrón mate, presenta la punta de color negra o la parte inmediatamente inferior a la punta negra con la punta blanca. Presentan una textura fibrosa.



Fig.4.9.: A) Aspecto macroscópico del Morfotipo 3, B) Detalle de la punta, C) Apariencia de las micorrizas encontradas en campo.

Sin apenas hifas emergentes, las existentes son tortuosas y sin ornamentación, con una longitud media $25,50 \pm 2,48$ μ m y sin fíbulas. El manto, oscuro (Fig.4.10.B), presenta un espesor de $32,17 \pm 2,56$ μ m, estructurado en 2 capas: una primera capa de prosénquima

deshilachado de unos $20,20 \pm 1,58 \mu\text{m}$ y una segunda de pseudoparénquima en estructura de red de $10,95 \pm 1,16 \mu\text{m}$. La red de Hartig (Fig.4.10.A) penetra muy poco encontrándose tan solo en las células epidérmicas o muy eventualmente en la primera capa de células corticales.

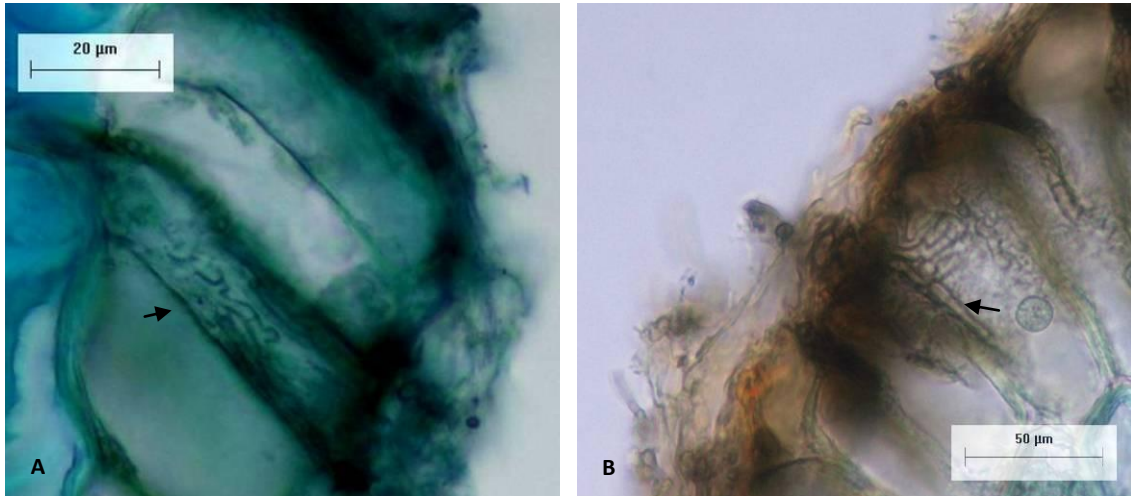


Fig.4.10.: A) Corte longitudinal, teñido con azul de toluidina, la flecha marca las huellas de las hifas sobre las células epidérmicas, B) Corte transversal, teñido con azul de algodón, La flecha indica la red de Hartig.

La secuencia obtenida de la región ITS (Fig.4.11.) de este morfotipo fue de 432 pb. Al realizar el BLAST, el resultado mostró una alta similaridad (*Blast score* = $3e-157$; *Query coverage* = 92%) con secuencias del ascomiceto *Meliniomyces* sp. (Secuencia ID: KC007335).

```

Query 1      CTATTCCCAAACCGTGTATACATACCTTTGTTGCTTTGGAGGCCGCTTTTAGGNG-NG 58
Sbjct 371    CTATTCCCAAACCGTGTATACATACCTTTGTTGCTTTGGAGGCCGCTTTTAGGCGTTCG 430
Query 59     GNTCCGGT GACTGCGCCT--CAGAA GACCCAAACTCTTTTGT TTAGTGATGTCTGAGTT 115
Sbjct 431    GCTCCGGCTGACTGCGCCTGCCAGAGGACCCAAACTCTTTTGT TTAGTGATGTCTGAGTA 490
Query 116    CTATATAAAGTTAAACTTTTAAACAACGGATCTTTTGGTTCTGGCATCGATTAAGAACG 175
Sbjct 491    CTATATAAAGTTAAACTTTTAAACAACGGATCTTTTGGTTCTGGCATCGATTAAGAACG 550
Query 176    CAGCGAAATGCGAAAGNNAAGCGGATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 235
Sbjct 551    CAGCGAAATGCGAATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC 610
Query 236    GCACATTGCGCCCCTTGGTATYCCGAGGGB-ATG-CTNITCGAGCGTCATTAT-ACCACT 292
Sbjct 611    GCACATTGCGCCCCTTGGTATYCCGAGGGBATGCTCTTTCGAGCGTCATTATAACCACT 670
Query 293    CAAGCCTC-GCTTGGTCTTGGGGT- CGCGGTCTC- CGVVCCYTTAAAATCAGTTCGCGGT 348
Sbjct 671    CAAGCCTCGCTTGGTCTTGGGGTTCGCGGTCTC- CGGCCC-TTAAAATCAGTTCGCGGT 729
Query 349    CCGTCTGGTCTWAGONTAGTAA-TTTTCTCGCTATAGGGNCTAGGCCACCCCT-CCAA 405
Sbjct 730    CCGTCTGGCTCTAAGCGTAGTAANTTTTCTCGCTATAGGGTCTAGGCGACCACCTGCCAA 789
Query 406    A-CCCCCN--TCTTTACAGTNGAON-CGGAT 432
Sbjct 790    AACCCCCATCTTTACGGTTGACCTCGGAT 820
    
```

Fig.4.11.: Secuencia consenso (5'-3') del Morfotipo 3 (Query) en negro, alineada con la secuencia KC007335 de *Meliniomyces* sp. (Sbjct) rojo. Las diferencias entre las secuencias se remarcán.

Populus nigra:

Morfotipo 4: Presente en P-C1. Ectomicorrizas dicotómicas tendiendo a monopodiales-pinnadas (Fig.4.12.A). Longitud del sistema $3,04 \pm 0,27 \text{ mm}$, longitud de la punta $1,59 \pm 0,20 \text{ mm}$ (Fig.4.12.B), ancho de la punta $0,31 \pm 0,01 \text{ mm}$, ancho del eje mayor

0,35 ± 0,03 mm, ancho de la base de la punta 0,33 ± 0,02 mm. De color blanco mate, punta derecha o tortuosa, presenta una textura aterciopelada. Se observan numerosos rizomorfos y se localizan en la parte superior del sistema radicular.



Fig.4.12.: A) Aspecto macroscópico del Morfotipo 4, B) Detalle de la punta.

Con escasas hifas emergentes (Fig.4.13.B), las existentes son tortuosas y verrugosas, con una longitud media $46,89 \pm 6,28 \mu\text{m}$ y con abundantes fíbulas. El manto presenta un espesor de $28,82 \pm 1,99 \mu\text{m}$, estructurado en 2 capas: una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red de unos $15,70 \pm 0,93 \mu\text{m}$ y una segunda de pseudoparénquima irregular de $11,42 \pm 1,16 \mu\text{m}$. Presenta una red de Hartig bien desarrollada (Fig.4.13.A), que se extiende hasta la segunda o tercera capa de células corticales.

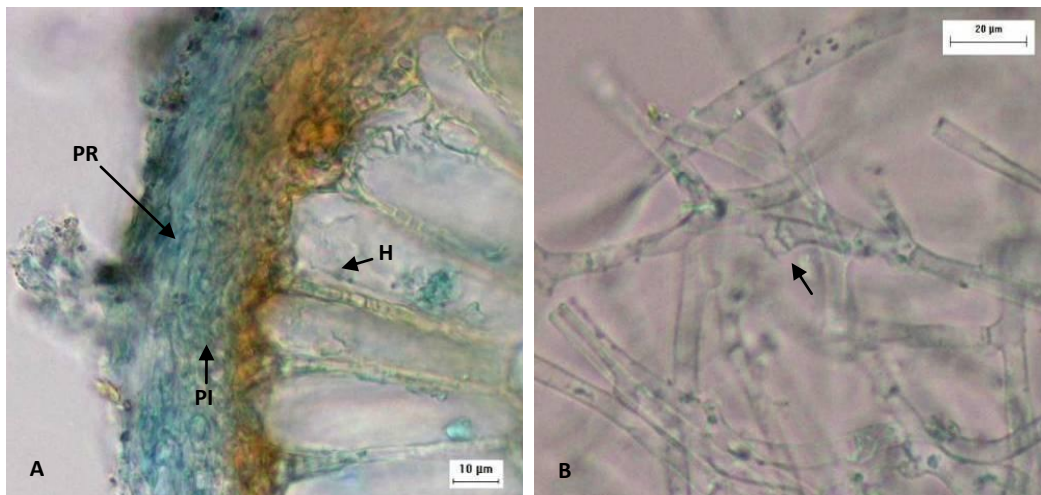


Fig.4.13.: A) Corte transversal, teñido con azul de algodón. H indica red de Hartig, PR indica Pseudoparénquima en estructura de red, PI indica Pseudoparénquima irregular, B) La flecha marca una de las fíbulas presentes en las hifas emergentes.

La secuencia obtenida de la región ITS (Fig.4.14.) de este morfotipo fue de 650 pb. Al realizar el BLAST, el resultado mostró una alta similitud (*Blast score* = 0.0; *Query coverage* = 100%) con secuencias de *Scleroderma bovista* (Secuencia ID: GQ267487).

Query	1	GAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGATCGAACCTCTGGGAGGGGGAGGGCTT	CCCGAA	59
Sbjct	48	GAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGATCGAACCTCTGGGAGGGGGAGGGCTT	CCCGAA	107
Query	60	CCCTTTCGAGGCNTTGCAGCCCTCTAACACCTGTGTGCACCCACTGTAGGTCCTTAGGGA		119
Sbjct	108	CCCTTTCGAGGCCTT-CAGCCCTCTAACACCTGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTAGGGA		166
Query	120	CCTATGTCTTCTTCGAACTCGCATGTCTACAGAATGTCGTCCGTGACCTCGGTCACAGGA		179
Sbjct	167	CCTATGTCTTCTTCGAACTCGCATGTCTACAGAACGTCGTCCGTGACCTCGGTCACAGGA		226
Query	180	AACCTAATACAACCTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCG		239
Sbjct	227	AACCTAATACAACCTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCG		286
Query	240	AATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC		299
Sbjct	287	AATCGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC		346
Query	300	CTTGCGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATCGAAACATCAGATC		359
Sbjct	347	CTTGCGCTCCTCGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATCGAAACATCAGATC		406
Query	360	GAAGCTTTCGACCTCGTCGGAGCTCGGTTTGGACTTATGGGAGTCTGCGGGCGAACCTC		418
Sbjct	407	GAAGCTTTCGACCTCGTCGGAGCTCGGTTTGGACTTATGGGAGTCTGCGGGCGAACCTC		466
Query	419	CCGTCGGGGGGACGTCGGCTCTCCTCAAAAGCATTAGCGTTGGGTGCGAGCCTCGCGTG		477
Sbjct	467	CCGTCGGGGGGACGTCGGCTCTCCTCAAAAGCATTAGTGTGGGTGCGAGCCTCGCGTG		526
Query	478	GCACGGCCTCTTCGACGTCATAATGACCGTCGTGGGCTGGAAGTGCCTGGATCGTAGATG		537
Sbjct	527	GCACGGCCTCTTCGACGTCATAATGACCGTCGTGGGCTGGAAGTGCCTGGATCGTAGATG		586
Query	538	CCCCTCGCTCTCCAACCTCTGCGAGCCCGGTCCGTCCGGCCGCGTGTATCGAAGCTTGAC		597
Sbjct	587	CCCCTCGCTCTCCAACCTCTGCGAGCCCGGTCCGTCCGGCCGCGTGTATCGAAGCTTGAC		646
Query	598	CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA		650
Sbjct	647	CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA		699

Fig.4.14.: Secuencia consenso (5' - 3') del Morfotipo 4 (Query), alineada con secuencia la GQ267487 de *S. bovista* (Sbjct). Las diferencias entre las secuencias se remarcen.

4.3.3. Descripción e identificación de endomicorrizas y otros endófitos

Del total de los 5 ejemplares estudiados, 3 de ellos (B-F3, S-D2 y P-C1) presentan endomicorrizas y/o otros endófitos. A continuación se describen las asociaciones encontradas en cada caso:

***Betula celtiberica* B-F3:** En el sistema radical de este árbol, junto al morfotipo 2, también aparecen raíces blancas y lisas, derechas o tortuosas, con la punta redondeada y sin signos de necrosis, rodeadas de micelio blanco poco denso (Fig.4.15.).



Fig.4.15.: Características macroscópicas de las raíces blancas encontradas en B-F3.

Una vez clarificadas se observa la presencia de endomicorrizas de tipo *Paris* caracterizadas por la presencia de hifas intracelulares en ovillo (Fig.4.16.C), especialmente en las células corticales próximas a los puntos de entrada. Aparecen numerosas vesículas inter e intracelulares, globosas o elipsoidales (Fig.4.16.B) parecidas a las descritas en el género *Glomus* y muy escasos arbuscúlos teñidos muy tenues (Fig.4.16.D), con numerosas y finas ramificaciones y que aparecen bastante degradados. Adheridas a la raíz se observan lo que podrían ser *Archaeosporas* germinado (Fig.4.16.A).

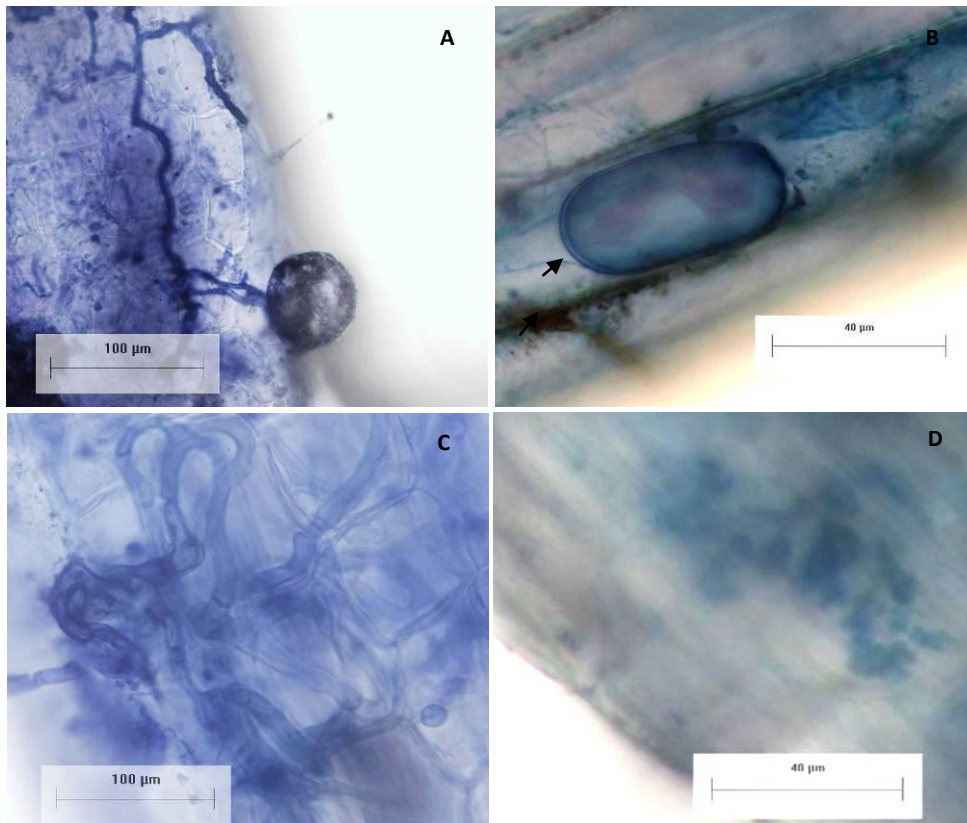


Fig.4.16.: A) Posible *Archaeospora* germinado adherida a la superficie, B) Vesícula elipsoidal, posiblemente del género *Glomus*, la flecha indica la doble capa existente en la pared, C) Hifas en ovillo presentes en las células epidérmicas, D) Arbúsculo intracelular.

Por otro lado y coexistiendo en las mismas raíces aparecen los denominados endófitos septados oscuros (DSE), caracterizados por la presencia de microesclerocios (Fig.4.17.). Las hifas oscuras y de menor grosor que las de las endomicorrizas discurren de manera tortuosa a lo largo de las células corticales.



Fig.4.17.: Microesclerocios intracelulares característicos de DSE.

A partir del semillero de *Allium ampeloprasum* elaborado con la rizosfera de este individuo se consiguió la infección efectiva de sus raíces. En este caso se observan endomicorizas tipo *Arum*, caracterizadas por la presencia de hifas intercelulares longitudinales, arbuscúlos (Fig.4.18.B) y vesículas intracelulares y extracelulares (Fig.4.18.A), y por tanto diferentes a las observadas en las raíces de B-F3. En ningún caso se han visto DSE en estas raíces.

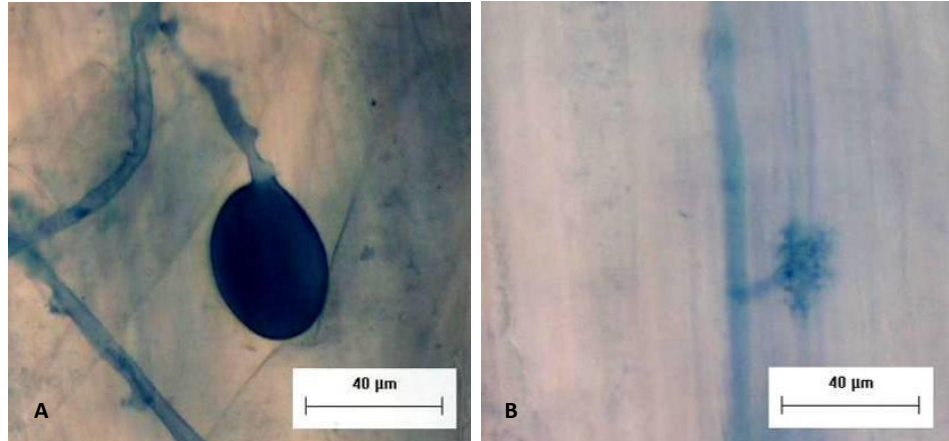


Fig.4.18.: A) Vesícula teñida intensamente, B) Arbúsculo.

***Salix atrocinerea* S-D2:** Al igual que en B-F3, en el mismo sistema radical que el morfotipo 3, aparecen raíces blancas y lisas, derechas, con la punta redondeada y sin signos de necrosis (Fig.4.19.).



Fig.4.19.: Características macroscópicas de las raíces blancas encontradas en S-D2.

Al igual que en el caso anterior, aparecen endomicorizas tipo *Paris*, con hifas intracelulares en ovillo en las células corticales próximas a los puntos de entrada. Se observan numerosas vesículas inter e intracelulares, elipsoidales, parecidas a las descritas en el género *Glomus*, así como otras intracelulares rectangulares ocupando toda la célula que podrían corresponder al género *Acaulospora* (Fig.4.20.D). En este caso se encuentran un elevado número de arbuscúlos con numerosas ramificaciones finas (Fig.4.20.A) aunque también parecen estar algo degradados. Aparecen además estructuras esféricas que podrían ser de diferentes tipos de esporas, encontrándose unas pequeñas (20-25 µm), intensamente teñidas que podrían tratarse de *Glomus tenue* por su pequeño tamaño (Fig.4.20.C), así como otras de color marrón oscuro de mayor tamaño (50-55 µm) que podrían ser de otro *Glomus* ya que presentan hifa de sustentación (Fig.4.20.B).

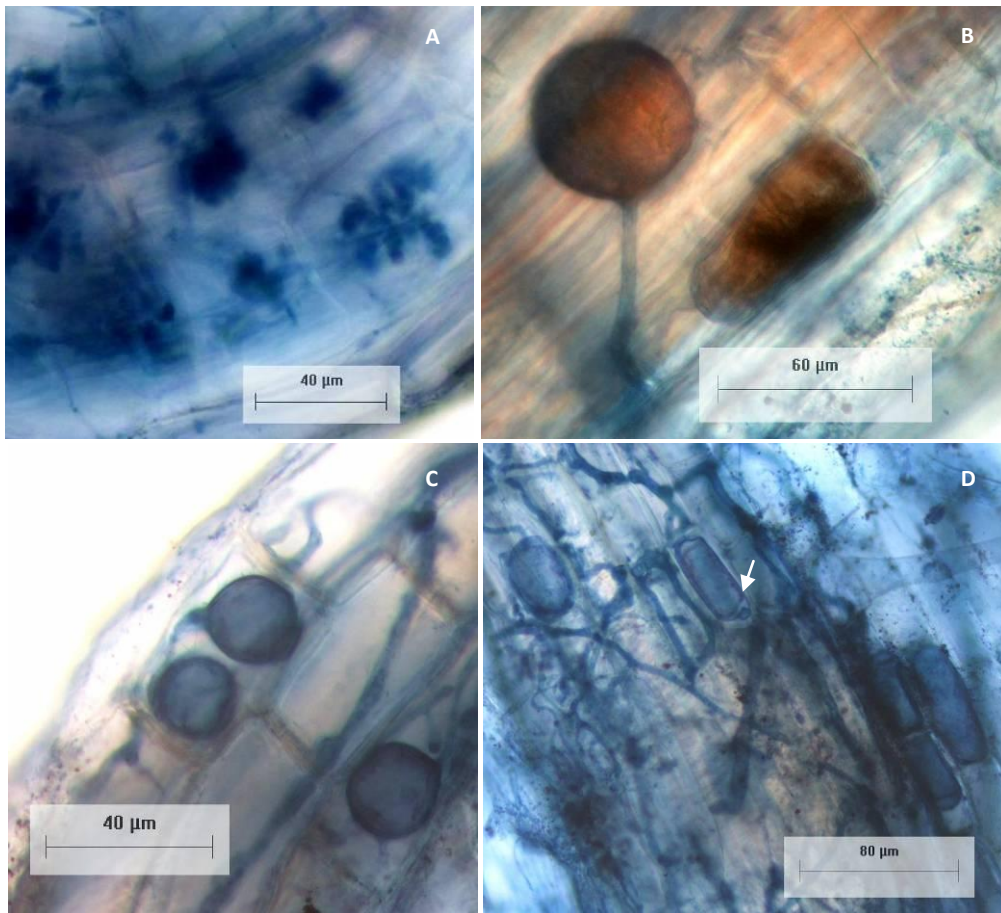


Fig.4.20.: A) Arbúsculos, B) Posible esporas de *Glomus* en el interior de la raíz, C) Esporas globosas intercelulares que pudieran ser de *Glomus tenue*, D) Vesículas rectangulares intracelulares típicas de *Acaulospora*. La flecha señala los posibles lípidos presentes en ellas.

De igual manera que en *B. celtiberica*, también se observan DSE con numerosas células ocupadas por microesclerocios (Fig.4.21.B) con hifas intracelulares finas y oscuras discurriendo tortuosamente por las células corticales. Adicionalmente se observó la presencia de un “endófito hialino”, muy escaso y solo visible mediante la tinción de lípidos (Fig.4.21.A), que muestra un elevado número de vacuolas dispuestas linealmente característico de este tipo de organismos.

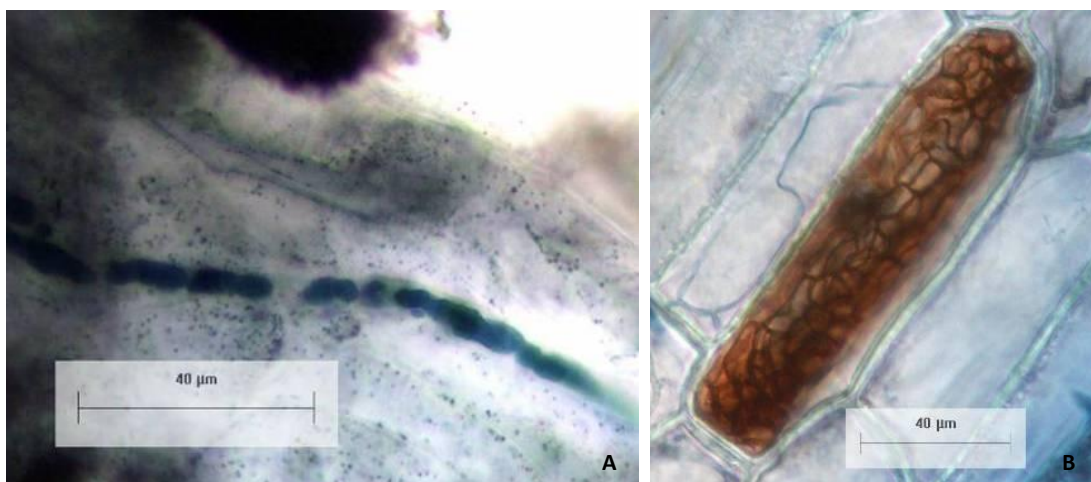


Fig.4.21: A) Endófito septado hialino con elevado número de vesículas lipídicas lineales, B) Microesclerocios intracelulares de DSE.

Al igual que en caso de anterior, también se consiguió una infección efectiva de las raíces de *A. ampeloprasmum* a partir de esporas presentes en la rizosfera de las raíces de S-D2. Las micorrizas obtenidas son de tipo *Arum*, presentando vesículas globosas intercelulares (Fig.4.22.A) y arbusculos intracelulares (Fig.4.22.B). No se observa en ningún caso la presencia de endófitos.

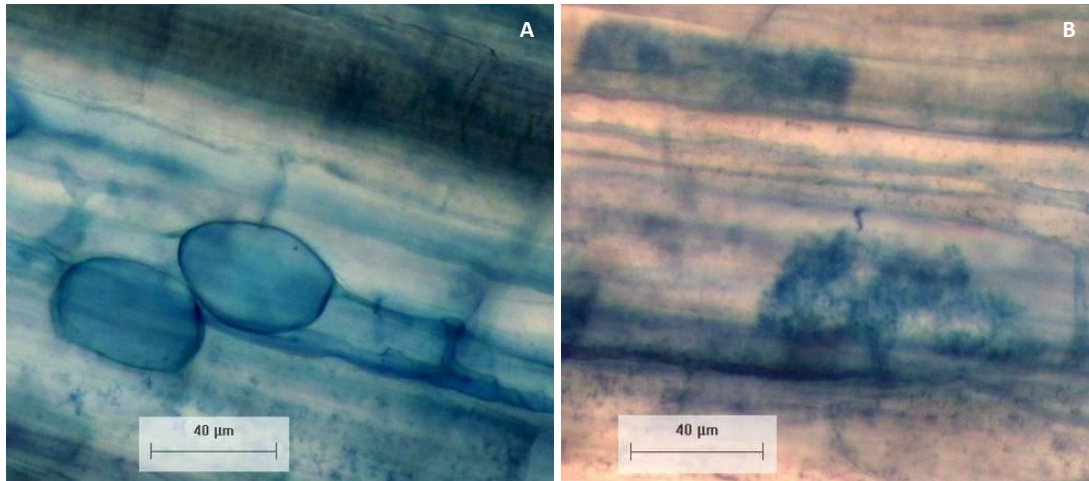


Fig.4.22.: A) Vesículas intercelulares, B) Arbusculos intracelulares.

***Populus nigra* P-C1:** Como en los casos anteriores, junto con el morfotipo 4 aparecen raíces blancas cortas sin ramificar, con la punta redondeada y sin signos de necrosis (Fig.4.23.).



Fig.4.23.: Características macroscópicas de las raíces blancas encontradas en *Populus nigra* (P-C1).

En este caso las endomicorrizas son de tipo *Arum*, con hifas intracelulares longitudinales, numerosos arbusculos (Fig.4.24.B) intercelulares que se tiñen más intensamente que en los casos anteriores (Fig.4.24.A) y escasas vesículas. Las observadas son muy grandes de morfología amigdaliforme (Fig.4.24.D). Además también se observan estructuras con morfología globosa e intensamente teñidas (Fig.4.24.C) que podrían tratarse de esporas. No se observa la presencia de ningún tipo de endófito.

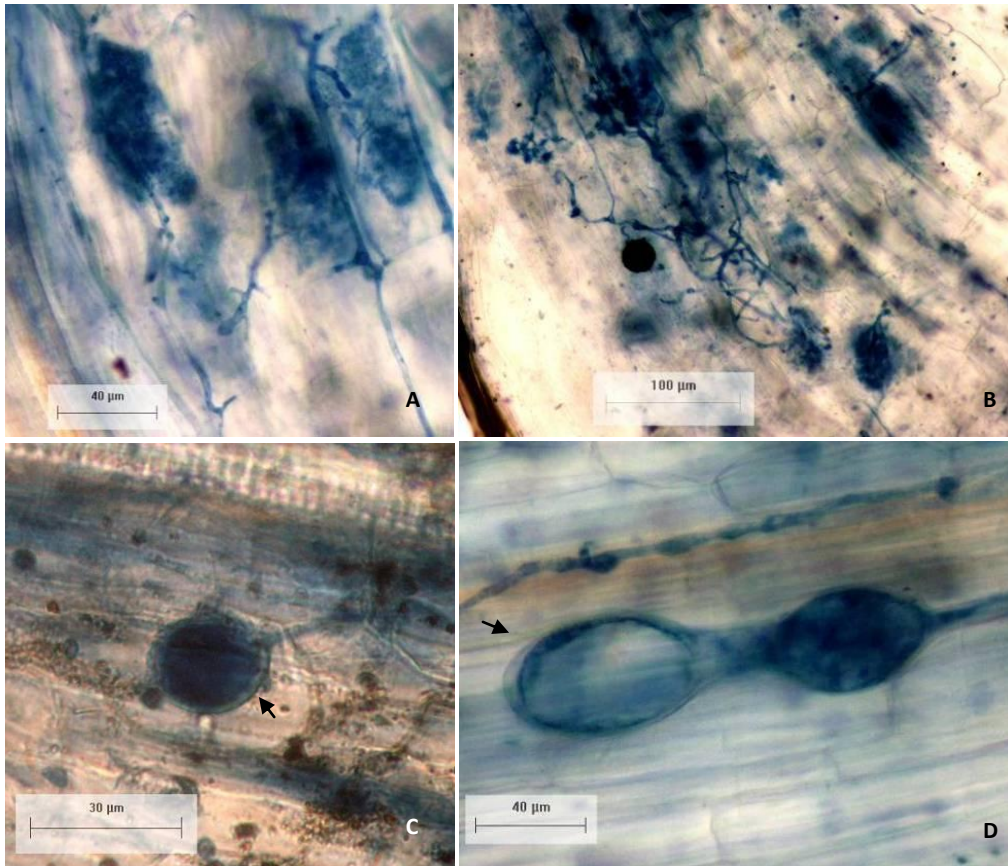


Fig.4.24: **A)** Arbúsculos intracelulares intensamente teñidos, **B)** Elevado número de arbúsculos en contraste con la escasez de vesículas, **C)** Posible espora intercelulares globosas. La flecha indica las 2 capas que constituyen la pared, **D)** Vesículas amigdaliformes. La flecha indica las dos capas que forman la pared.

En este caso en los puerros sembrados en la rizosfera de P-C1 no se observó una colonización clara. Extracelularmente se puede apreciar micelio, esporas y alguna vesícula (Fig.4.25.B) que podrían pertenecer a hongos arbusculares, pero intracelularmente no se ve tan clara esta colonización, mostrando unas esporas muy pequeñas (Fig.4.25.A) que podrían no tratarse de un hongo arbuscular.

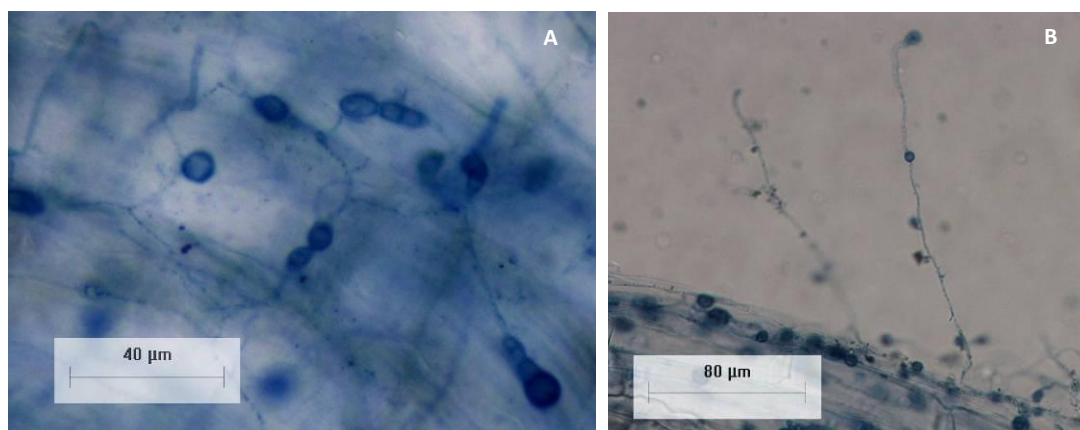


Fig.4.25.: **A)** Hifas intracelulares con pequeñas esporas, **B)** Hifas extracelulares, vesículas y esporas.

4.3.4. Generación de esporas y determinación taxonómica

A partir de las plantas trampa crecidas en la rizosfera de B-F3, S-D2 y P-C1, y tras un periodo de estrés hídrico se consiguió la producción de las siguientes esporas de hongos arbusculares:

Archaeospora: Estas esporas se encuentran en la tierra de las plantas trampa de B-F3, S-D2 y P-C1, siendo en este último caso la única espora identificada. No se observan ningún tipo de diferencia entre ellas por lo que se tratarían de una misma especie. Son de color hialino o blanco cremoso (Fig.4.26.A), oscureciéndose en las degradadas o parasitadas. Globosas o subglobosas de 40-80 μm de tamaño. No reacciona ante la tinción de Melzer. La pared está constituida por 3 capas hialinas unitarias no muy flexibles (Fig.4.26.B).



Fig.4.26.: A) *Archaeospora* sp. Intacta en B-F3 en PVLG, B) Espora rota, la flecha señala las capas hialinas de la pared, en P-C1, en PVLG.

Septoglosum: Estas esporas se encuentran en la tierra de las plantas trampa de B-F3 y S-D2. Globosas o subglobosas, de 90-120 μm tamaño y de color naranja amarronado (Fig.4.27.). Presentan hifa de sustentación recta o recurvada, cilíndrica, con forma de embudo en la base de la espora. Se distinguen 2 capas en la pared de la espora (L1 y L2). Una primera capa (L1) muy fina hialina, y en esporas maduras ausente, que no reacciona al reactivo de Melzer. Y una segunda capa (L2) laminada de color amarillo marrón, que continua en la pared interna de la hifa de sustentación, y que reacciona ante el reactivo de Merzel tomando una coloración marrón rojiza.

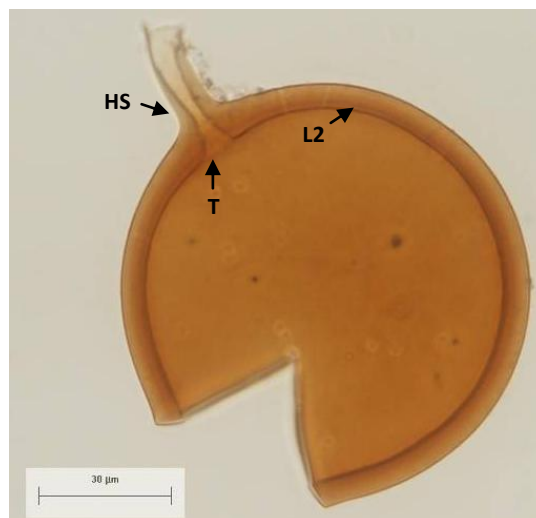


Fig.4.27.: *Septoglosum* sp. en S-D2 en PVLG:Merzel. HS indica hifa de sustentación, T tabique y L2 segunda capa de la pared de la espora.

Paraglomus: Solo se ha localizado en la tierra de las plantas trampa S-D2. En concreto las esporas se encontraron en el interior de otra espora de mayor tamaño de tipo globoide (Fig.4.28.). Se tratan de esporas globoides o subgloboides, de entre 50-60 μm tamaño, hialinas. No se observa una reacción aparente ante reactivo de Merzel. Las paredes de las esporas son hialinas, aunque no se han podido identificar las capas. Dadas todas estas características, podrían tratarse de la especie *Paraglomus occultum*.

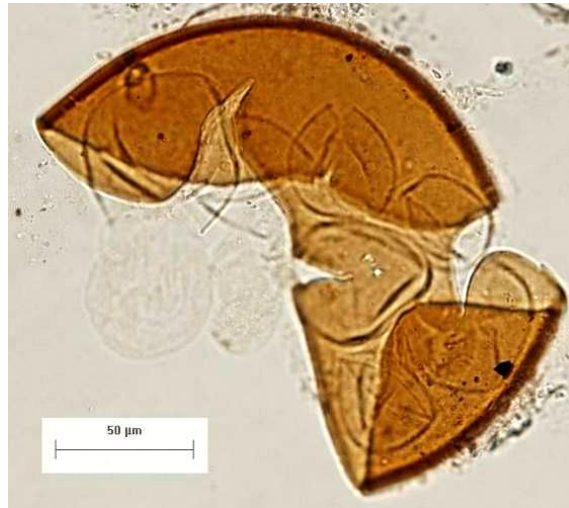


Fig.4.28.: *Paraglomus occultum* en S-D2 parasitando el interior de otra espora globoide, en PVLG.

Acaulospora: Estas esporas se encuentran en la tierra de las plantas trampa con la rizosfera de B-F3 y S-D2, siendo especialmente abundantes en el caso de B-F3. Esporas globosas, de entre 70-90 μm , amarillas cremosas en PVLG y amarillo anaranjadas en PVLG-reactivo de Merzel. Las esporas presentan una pared externa (Fig.4.29.) en la que solo se ha conseguido diferenciar una única capa (L1) laminada anaranjada, y unas paredes internas compuestas por dos capas hialinas y flexibles (GW1 y GW2) denominadas paredes germinales.



Fig.4.29.: *Acaulospora* sp. en B-F3 en PVLG:Merzel. L1 capa externa de la pared de la espora, GW1 primera capa germinal interna y GW2 segunda capa germinal interna.

Glomus: Adicionalmente, tanto en las plantas de trampa de B-F3 y S-D2, aparecen esporas que pueden pertenecer a este género. Son globoides o subgloboides, de entre 90-120 μm (Fig.4.30). De color marrón anaranjado en PVLG y amarillo anaranjado en PVLG:Merzel. En la pared de la espora se distinguen 2 capas, una primera hialina muy fina (L1) que no reacciona al reactivo de Merzel, y una segunda laminada rojiza en PVLG:Merzel (L2). Presentan hifa de sustentación recta o recurvada.



Fig.4.30.: *Glomeraceae* en B-F3 en PVLG:Merzel. HS indica hifa de sustentación, L1 primera capa de la pared y L2 segunda capa de la pared de la espora.

4.4. Discusión

El examen de las raíces de los ejemplares de *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra* crecidos en un suelo altamente contaminado de Nitrastur, nos han permitido comprobar la diversidad y complejidad de la comunidad fúngica, estableciéndose diferentes tipo de asociaciones entre las plantas y los hongos (ectomicorrizas, micorrizas arbusculares y endófitos septados oscuros (DSE)), incluso dentro de un mismo individuo. En este trabajo hemos considerado el término ectomicorrizas para aquellas estructuras que se ajustan a la definición dada por Brundrett (2004), es decir, en las que un manto de hifas encierra a las raíces laterales cortas y se genera una laberíntica red de hifas entre las células de la raíz denominada red de Hartig, tal como se expuso en el Capítulo 1. En la Tabla 4.2. se muestran los árboles analizados y los tipos de asociación o microorganismo fúngico detectado.

Tabla 4.2.: Tipos de de asociación o microorganismo fúngico detectado. AM indica tipo de micorriza arbuscular. DSE endófito septado oscuro.

Individuo	Ectomicorrizas			AM	Otras asociaciones	
	Morfotipo	Hongo				
B-C1	1	<i>S. citrinum</i>				
B-D3	1	<i>S. citrinum</i>				
B-F3	2		Helotial	<i>Paris</i>	DSE	
S-D2	3		<i>Melinioyces</i> sp.	<i>Paris</i>	DSE	Endofito hialino
P-C1	4	<i>S. bovista</i>		<i>Arum</i>		

Tras un estudio macro y microscópico de las raíces de los diferentes individuos seleccionados, se diferenciaron 4 morfotipos de ectomicorrizas que se identificaron mediante la amplificación y secuenciación de las regiones ITS. En abedul se identificó el Basidiomycete *Scleroderma citrinum* y un Helotial; en sauce un Ascomycete perteneciente al género *Melinioyces* y finalmente, en el chopo *S. bovista*.

Estos datos nos indican que el género *Scleroderma* parece ser abundante en la colonización de los individuos juveniles de esta zona. Tradicionalmente este género es descrito como de etapas tempranas de la sucesión (Mason *et al.*, 1983), y como un colonizador primario en escombreras de carbón y otras minerías (Ingelby *et al.*, 1985; Newton, 1992). Este hecho parece ser debido a su elevada capacidad de producir rizomorfos altamente diferenciados o de tipo F (Agerer, 1991), que le permiten hacer exploraciones a larga distancia (Agerer, 2001), y por tanto propagarse rápidamente y colonizar sistemas radiculares juveniles (Jeffries, 1999). A pesar de estos datos, los trabajos de Jones y Hutchinson (1988) y Colpaert y Van Assche (1993), sugieren que es un género poco tolerante a las altas concentraciones de metales. Dada la zona en la que encontramos las dos especies de *Scleroderma*, que se corresponden con las tasas más altas de contaminación de la parcela seleccionada (Capítulo 2-Tabla 2.2.), parece que los ecotipos presentes en este emplazamiento deben de presentar algún mecanismo de tolerancia frente a este estrés.

Por otro lado, Colpaert y Van Assche (1993) sugieren que con altas concentraciones de Cd en el suelo, *S. citrinum* es capaz de comportarse como un parasito del hospedador, pero en nuestro estudio, la planta de abedul (B-D3) que estaba micorrizada por esta especie fúngica y situada en un suelo con valores de 107 mg Kg⁻¹ Cd, no presentaba ningún síntoma que diese a entender un efecto negativo por parte del hongo.

El hecho de que se hayan encontrado, a pocos metros de distancia, 2 especies de *Scleroderma*, asociadas a hospedadores diferentes (*B. celtiberica*-*S. citrinum* y *P. nigra*-*S. bovista*) nos puede indicar que los mecanismos de tolerancia están asociados al género, y que

existe una especificidad entre planta y hongo. Ambas especies presentan unas características macroscópicas y microscópicas muy similares, diferenciándose solamente en su distribución en el sistema radicular y en el espesor de las diferentes capas que estructuran el manto, haciéndolas prácticamente indistinguibles mediante la identificación por morfotipos. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de la utilización de las técnicas de biología molecular para una correcta identificación de las especies fúngicas presentes en las raíces.

Otra característica observada fue que los ejemplares de abedul infectados con *S. citrinum* no presentaban ningún otro tipo asociación fúngica en sus raíces, mientras que el chopo infectado con *S. bovista* presentaba micorrizas arbusculares en las raíces anexas. *Populus* es uno de los pocos géneros que se ha descrito capaz de desarrollar ambos tipos de micorrizas (Vozzo y HacsKaylo, 1974; Malloch y Malloch, 1981; Brundrett *et al.*, 1990) en todo tipo de suelos (Karliński *et al.*, 2010). Estas relaciones simbióticas se ven afectadas por múltiples factores que van desde el genotipo de *Populus*, la tolerancia a los metales pesados, la distribución de las raíces finas, edad o la profundidad del suelo. Parece que esta coexistencia es posible ya que estos 2 tipos de micorrizas utilizan diferentes recursos del suelo y por tanto ocupan diferentes nichos ecológicos (Neville *et al.*, 2002). En nuestro caso las micorrizas arbusculares presentes son de tipo *Arum*, observándose una colonización muy abundante y numerosos arbusculos en contraste con escasas vesículas. Este hecho puede ser debido a la profundidad de recogida de la muestras, ya que de acuerdo con Neville *et al.* (2002), no existen diferencias significativas en el porcentaje de arbusculos u ovillos presentes según la profundidad, pero si en el número de vesículas siendo estas más numerosas a profundidades mayores de 10 cm. En nuestro caso las raíces de *Populus* recogidas discurrían más superficiales nunca excediendo esta profundidad.

También se ha detectado más de un tipo de colonización en otros árboles analizados. Así, en un abedul se observaron unas micorrizas muy oscuras (Morfotipo 2), reticuladas y que contrastaban con el resto de las raíces de este individuo. Al realizar el examen microscópico observamos un manto totalmente estructurado y una red de Hartig bien desarrollada. Mediante la amplificación y secuenciación de las región ITS, y tras realizar un BLAST, identificamos al hongo presente como un hongo perteneciente al orden Helotiales. De igual manera en un ejemplar de sauce se encontró unas micorrizas con una morfología atípica (Morfotipo 3), oscuras y que destacaban en comparación con el resto de las raíces blancas de este individuo. Al realizar el examen microscópico observamos un manto muy fino y una red de Hartig que solo penetraba en las células epidérmicas. Mediante la amplificación y secuenciación de las región ITS, y tras realizar un BLAST, identificamos al hongo presente como *Meliniomyces* sp., perteneciente al complejo *Meliniomyces-Rhizocyphus* dentro del orden Helotiales. Sería necesario realizar un análisis filogenético de estos organismos para poder concretar, sino la especie, el clado al que pertenece dentro de este orden (Capítulo 5).

El orden Helotiales incluye un grupo ecológicamente muy diverso y complejo de hongos patógenos, saprófitos, endófitos septados oscuros (DSE), parásitos de otros hongos y formadores de micorrizas ericoides y ectomicorrizas (Vrålstad *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2009), llegando en algunos casos un mismo hongo a presentarse en diferentes roles dependiendo del hospedador como es el caso de *Cadophora finlandica* (Jumpponen, 2001; Yu *et al.*, 2001; Wilcox y Wang, 1987). Adicionalmente, este orden parece ser especialmente abundante en suelos contaminados (Cevnik *et al.*, 2000; Vrålstad *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2012). Una de las características principales de estos hongos encontrados en zonas contaminadas, y que se observa también en nuestros resultados, es que son muy oscuros debido a que contienen una gran cantidad de melanina, que se sabe desempeña un papel importante en la inmovilización de metales y en la capacidad que poseen los hongos de actuar como biosorbentes (Gadd, 2007).

En abedul y sauce, además de poseer una misma planta ectomicorrizas y micorrizas arbusculares, también se detectó la presencia de otro tipo de asociación. En ambos casos se observaron microesclerocios típicos de DSE, encontrándose además un “endófito hialino” en el caso del sauce.

En el género *Salix* se han descrito simultáneamente ectomicorrizas y micorrizas arbusculares (Dhillion, 1994; van der Heijden, 2001). Para algunos autores (Hrynkievick *et al.*, 2009), el DSE *Phialocephala fortinii* podría inducir la estructura de una ectomicorriza. En este sentido, Fernando y Currah (1996) observan, en un mismo sistema radicular de *Salix glauca*, que *P. fortinii* es capaz de formar ectomicorrizas en algunas raíces y penetrar intracelularmente en otras dando lugar a los microesclerocios típicos de los DSE. Es por esto, que los microesclerocios observados en estas raíces de sauce podrían ser causados por el *Meliniomyces* sp. identificado previamente, y no por otro DSE.

En las mismas raíces blancas del sauce, en las que se observaron los DSE, también se detectaron hongos arbusculares generando micorrizas tipo *Paris*. En estas raíces se observan vesículas rectangulares con grandes acúmulos lípidos en su interior, característicos de *Acaulospora* y también esporas intracelulares de pequeño tamaño que coinciden con las características macroscópicas de *Glomus teneu* (Basion. *Rhizophagus tenuis*). Esto podría indicar que existen varias especies de hongos arbusculares en la misma raíz, pero sería necesario realizar un análisis de la estructura de sus paredes o un análisis molecular de las regiones ITS para confirmarlo.

Además, en esas raíces de sauce, también hemos observado la presencia de hifas hialinas mediante la tinción de lípidos. Estas hifas no se observaron en ningún momento con la tinción de azul de trypan y no parecen discurrir junto con las melanizadas, pertenecientes al DSE, por lo que no podemos concluir si se trata del mismo organismo capaz de este polimorfismo (Barrow y Aaltonen, 2001), o de otro hongo que se encuentra infectando las raíces.

Aunque se conocen árboles pertenecientes a las familias Salicaceae, Betulaceae y Mirtaceae que poseen ecto y micorrizas arbusculares, (Smith y Read, 1997), es la primera vez, que tengamos noticia, de esta situación en abedul. En concreto hemos observado lo que parecen ser *Archaeosporas* germinando sobre la superficie de las raíces y una colonización interna muy abundante con numerosos ovillos, por lo que las podemos considerar a estas micorrizas como tipo *Paris*, gran cantidad vesículas y unas estructuras escasas y algo degradadas que pueden tratarse de arbúsculos. Con todo ello, estos datos han de tomarse con cautela, ya que solo se han observado en un ejemplar, y en un suelo muy contaminado, por lo que será necesario un muestreo mucho más amplio para determinar la existencia de este tipo de asociación de manera normal en estas condiciones y si realmente esta asociación es funcional.

Adicionalmente encontramos microesclerocios en las mismas raíces colonizadas por endomicorrizas. Al igual que en *Salix* achacamos estos microesclerocios al Helotial causante de las ectomicorrizas. Se ha descrito que los DSE son más frecuentes que los hongos arbusculares en las raíces de las plantas en ambientes extremos, sugiriendo un reemplazamiento de los hongos arbusculares por los DSE (Postma, 2007). En nuestro caso se observa una clara coexistencia tanto en *Betula* como en *Salix*, estando nuestros datos de acuerdo con los resultados de Massenssini *et al.* (2013), en donde encuentran en un ecosistema alterado, que de 29 especies analizadas 27 presentaban ambas asociaciones, lo que parece que no se da este reemplazamiento.

Con el fin de ampliar el estudio de los hongos micorrícicos arbusculares en la zona contaminada, se realizó un cultivo de puerros (*Allium ampeloprasum*), como planta trampa con el suelo recolectado de la rizosfera del abedul, sauce y chopo en que se observó este tipo de asociación. El análisis de las raíces de *A. ampeloprasum*, mostró una infección efectiva en el caso de las plantas crecidas en la rizosfera de abedul y sauce, pero en esta planta trampa, las micorizas eran de tipo *Arum* y no de tipo *Paris* como en las raíces de los dos árboles. Este hecho puede ser debido a que el hongo que las formó no fuera el mismo que el que generó la de los árboles analizados, pudiendo ser las esporas formadoras originarias de otras plantas colindantes. Pero por otro lado, tampoco podemos descartar que sean las mismas, ya que se ha descrito que una misma especie de hongo arbuscular es capaz generar micorizas tipo *Paris*, *Arum* o estructuras intermedias dependiendo de la planta a la que infecte (Dikson *et al.*, 2007). En las raíces de las plantas trampa crecidas en la rizosfera del chopo no se encontraron estructuras de micorizas arbusculares. Solamente se detectaron unas esporas pequeñas (5-15 μ m) en su rizosfera que no se pudieron identificar.

Como continuación del estudio de los hongos arbusculares en la rizosfera de las plantas leñosas de la zona alterada, las plantas trampa se sometieron a un periodo de estrés hídrico para favorecer la formación de esporas de estos hongos en el sustrato. Por medio de un estudio morfológico, se detectaron 5 tipos de esporas. La identificación de estos hongos basándonos únicamente en caracteres morfológicos es problemática, siendo aconsejable un análisis filogenético multigénico (ITS-SSU-LSU). A pesar de esto, un análisis morfológico constituye un primer paso crucial para conocer la diversidad presente y para separar los diferentes tipos de esporas tanto para su posterior análisis molecular como para el establecimiento de cultivos monoespecíficos.

La clasificación de estos hongos es muy controvertida y en los últimos años se han producido numerosas reorganizaciones y cambios de nomenclatura (Stümer, 2012). El reconocimiento o no de diferentes familias y géneros ha derivado en diferentes clasificaciones consenso (Oehl *et al.*, 2011; Goto *et al.*, 2012; Redecker *et al.*, 2013), que hacen aún más complejo el poder establecer con seguridad la nomenclatura correcta de un individuo. En nuestro caso hemos decidido seguir la clasificación propuesta por Redecker *et al.* (2013) basada en caracteres morfológicos, en secuencias de alta calidad y en reglas que establece el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN). Según nuestro estudio, las esporas encontradas pertenecen a 5 géneros: *Acaulospora* (Acaulosporaceae), *Archaespora* (Archaeosporaceae), *Glomus* (Glomeraceae), *Septoglomus* (Glomeraceae) y *Paraglomus* (Paraglomeraceae). La más abundante y presente en la rizosfera de los 3 individuos ha sido *Archaespora*, siendo además el único tipo de espora encontrado en suelo procedente de *Populus*. Asimismo *Paraglomus* es el género más escaso, solo encontrándose en el suelo procedente del sauce, parasitando a otra espora globoide. En este caso sus características macroscópicas podrían indicar que se trata de *Paraglomus occultum*, aun así se debería confirmar mediante biología molecular.

Esta reducida diversidad de esporas de hongos arbusculares, ha sido observada por numerosos autores (Leyval y Joner, 2001; Regvar *et al.*, 2006), llegando Del Val *et al.* (1999) a afirmar que solo aquellos ecotipos mejor adaptados a estas condiciones son capaces de completar sus ciclos de vida. La identificación, aislamiento y propagación de estos ecotipos, permitirá hacer estudios encaminados a conocer los mecanismos que permiten incrementar la tolerancia o acumulación de metal por parte de las plantas (Hall, 2002; Regvar *et al.*, 2006; Tonin *et al.*, 2001). Además, estos resultados abren una interesante vía de investigación sobre el posible papel que desempeñan este tipo de hongos en plantas forestales en terrenos altamente contaminados.

4.5. Bibliografía

- Agerer, R. (1990). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. 4th Delivery. Einhorn, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhizae. En: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Eds). Techniques for the study of mycorrhiza. (Methods in microbiology, vol 23) Academic, London. pp. 25-73.
- Agerer, R. (2001). Exploration types of Ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza*. 11:107-114.
- Barrow, J.R. y Aaltonen, R.E. (2001). Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*. 13:239-247.
- Brundrett, M., Murase, G., Kendrick, B. (1990). Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Can J Bot*. 86:551-578.
- Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. En: Macfayden, A., Begon, M., Fitter, A.H. (Eds) *Advances in Ecological Research*, Vol. 21. Academic Press, London. pp. 171-313.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Groveg, T., Malajczuck, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph* 32. 374 pp.
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 79: 473-495.
- Cevnik, M., Jurc, M., Vodnik, D. (2000). Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea* L. From the area influenced by the Zerjav lead smelter (Slovenia). *Phyton-Ann Rei Bota*. 40:61-64.
- Colpaert, J.V. y Van Assche, J.A. (1993). The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.. *New Phytol*. 123:325-333.
- Débaund, J.C., Marmeisse, R., Gay, F. (1999). Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. En: *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Varma, A. y Hock, B. (Eds). Springer Verlag, Berlin, Alemania. pp. 79-113.
- Del Val, C., Barea, J. M., Azcon-Aguilar, C. (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl Environ Microb*. 65:718-723.
- Dhillon, S.S. (1994). Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, and *Rhizoctonia* sp. Of alpine and boreal *Salix spp*. In Norway. *Arct Alp Res* 26:304-307.
- Dikson, S., Smith, F.A., Smith, S.E. (2007). Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next?. *Micorrhiza*. 17:375-393.

- Egger, K.N. (1995). Molecular analysis of ectomycorrhizal fungi communities. *Can J Bot.* 73:S1415-S1422.
- Fernando, A.A. y Currah, R.S. (1996). A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Can J Bot.* 74:1071-1078.
- Gadd, G.M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res.* 3:3-49.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D., Taylor, J.W. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can J Bot.* 69:180-190.
- Gardes, M. y Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molec Ecol.* 2:113-118.
- Gerdemann, J.W. y Nicolson, T.H. (1963). Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc.* 46:235-244.
- Goodman, D.M., Durall, D.M., Trofymow, J.A., Berch, S.M. (1996). A manual of concise descriptions of north american ectomycorrhizae. Mycologue Publications, and the Canada -BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria, B.C.
- Goto, B.T., da Silva, G.A., de Assis, D.M., Silva, D.K.A., Souza, R.G., Ferreira, A.C.A., Jobim, K., Melo, C.M.A., Viera, H.E.E., Maia, L.C., Oehl, F. (2012). Intraornatospora (Gigasporales), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon.* 119:117-132.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 366:1-11.
- Hedh, J., Samson, P., Erland, S., Tunlid A. (2008). Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycol Res.* 112:965-975.
- Hryniewicz, K., Baum, C., Leinweber, P. (2009). Mycorrhizal community structure, microbial biomass P and phosphatase activities under *Salix polaris* as influenced by nutrient availability. *Eur J Soil Biol.* 45:168-175.
- Ingleby, K., Last, F.T., Mason, P.A. (1985). Vertical distribution and temperature relations of sheathing mycorrhizas of *Betula spp.* Growing on coal spoil. *For Ecol Manage.* 12:279-285.
- Ingleby, K., Manson, P.A., Last, F.T. y Fleming, L.V. (1990). Identification of ectomycorrhizas. *Institute of Terrestrial Ecology Res.* pp. 112 .
- Jeffries, P. (1999). *Scleroderma*. En: Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (Eds). *Ectomycorrhizal Fungi Key genera in profile.* pp. 187-200.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Katarzyna, T., Barea, J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils.* 37:1-16.

- Jones, M.D. y Hutchinson, T.C. (1988). Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. II. Uptake of nickel, calcium, magnesium, phosphorus and iron. *New Phytol.* 108:461-470.
- Jumpponen, A. y Trappe, J.M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic roots-colonising fungi. *New Phytol.* 140:295-310.
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza.* 11:207-211.
- Karliński, L., Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B., Leski, T. (2010). Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza.* 20:315-324.
- Kormanik, P.P. y McGraw, A.C. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. Schenck, N.C. (Ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research.* The American Phytopathological Society, St Paul, pp. 37-45.
- Kranabetter, J.M. y Friesen J. (2002). Ectomycorrhizal community structure on western hemlock (*Tsuga Heterophylla*) seedlings transplanted from forests into openings. *Can J Bot.* 80:861-869.
- Leyval, C. y Joner, E.J. (2001). Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. En: Gobran GR, Wenzel WW, Lombi E (eds) *Trace elements in the rhizosphere.* CRC, Boca Raton, FL, pp. 165-185.
- Li, H.Y., Li, D.W., He, C.M., Zhou, Z.P., Mei, T., Xu, H.M. (2012). Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecol.* 5:309-315.
- Neville, J., Tessier, J.L., Morrison, I., Scarratt, J., Canning, B., Klironomos, J.N. (2002). Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus tremuloides* within a 3-year-old boreal forest clear-cut. *Appl Soil Ecol.* 19:209-216.
- Newsham, K.K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol.* 10:783-793.
- Malloch, D. y Malloch, B. (1981). The mycorrhizal status of boreal plants: species from northeastern Ontario. *Can J Bot.* 59:2167-2172.
- Mason, P.A., Wilson, J., Last, F.T. (1983). The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings in unsterile soil. *Plant Soil* 71:247-256.
- Massenssini, A.M., Bonduki, V.H.A., Tótolá, M.R., Ferreira, F.A., Costa, M.D. (2014). Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants. *Mycorrhiza.* 24:53-159.
- Mayerhofer, M.S., Kernaghan, G., Harper, K.A. (2013). The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza.* 23:119-128.

- Morton J.B. (1988). Taxonomy of mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*. 32:267-324.
- Morton, J.B. (1990). Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia*. 82:192-207.
- Newton, A.C. (1992). Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2:75-79.
- O`Dell, T.E., Massicotte, H.B., Trappe, J.M. (1993). Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. *New Phytol*. 124:93-100.
- Oehl, F., Silva, G.A., Goto, B.T., Sieverding, E. (2011). *Glomeromycota*: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon*. 116:75-120.
- Postma, J.W.M., Olsson, P.A., Falkegren-Grerup, U. (2007). Root colonization by arbuscular mycorrhizal, fine endophyte and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biol Biochem*. 39:400-408.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B., Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*. 23:515-531.
- Regvar, M., Vogel-Milkuš, K , Kugonič, N., Turk, B., Batič, F. (2006). Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: indications for the direction of phytosatabilisation?. *Environ Pollut*. 144:976-984.
- Rose, S.L. (1980). Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Can J Bot*. 58: 1449-1454.
- Smith, S.E. y Read D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- Schulz, B. (2006). Mutualistic interations with fungal root endophytes. En: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T.N. (Eds). *Microbial root endophytes*. Soil microbiology, vol.9. Springer, Berlin, pp. 261-279.
- Stürmer, S.L. (2012). A history of the taxonomy and systematic of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*. 22:247-258.
- Tedersoo, L., Pästel, K., Jairus, T., Gates, G., Pöldmaa, K., Tamm, H. (2009). Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environ Microbiol*. 11:3166-3178.
- Tellenbach, C., Grunig, C.R., Sieber, T.N. (2011). Negative effects on survival and performance of Norway spruce seedlings colonized by dark septate root endophytes are primarily isolate-dependent. *Environ Microbiol*. 13:2508-2517.
- Tonin, C., Vandenkoornhuyse, P., Joner, E.J., Straczek, J., Leyval, C. (2001). Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*. 10:161-168.

-
- Tommerup, I.C. (1992). Methods for the study of the population biology of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Eds.). *Methods in Microbiology*. Vol. 24. *Techniques for the Study of Mycorrhiza*. Academic Press, London, pp. 23-51.
- van der Heijden, E.W. (2001). Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza*. 10:185-193.
- Vozzo, H.E. y Hacskalyo, E. (1974). Endo- and ectomycorrhizal associations in five *Populus* species. *Bull Torrey Bot Club*.101:182-186.
- Vrålstad, T., Myhre, E., Schumacher, T. (2002). Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytol*. 155:131-148.
- Wang, B. y Qui, Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16:299-363.
- Wilcox, H.E. y Wang, C.J.K. (1987). Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Can J For Res*. 17: 884-899.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yu, T.E.J-C., Egger, K.N., Peterson, R.L. (2001). Ectendomycorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhiza*. 11:167-177.



CAPÍTULO 5

ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LOS HONGOS ECTOMICORRÍDICOS DE ZONAS CONTAMINADAS

5.1. Introducción

Uno de los problemas más importantes que nos encontramos al trabajar con hongos, es su correcta identificación taxonómica. Tradicionalmente la descripción de los caracteres macro (color, tamaño, forma, olor) y micromorfológicos (estudio de las esporas, anatomía del pileo, etc) de los esporocarpos ha sido clave para la identificación de los Agaricales y otros Macromycetes (Lodge *et al.*, 2004). Sin embargo muchas de estas características varían dependiendo de muchos factores tanto externos como internos, causando clasificaciones erróneas que, además, dificultan la repetitividad de resultados.

En la mayoría de las ocasiones, las características macroscópicas que definen a una especie se alteran en el momento que son recolectadas y secadas para su conservación (Lodge *et al.*, 2004), variando según el grado de madurez en el momento de la recolección y de la propia variabilidad genética en las poblaciones de una especie. Este hecho ha derivado en una considerable variación en el número de especies reconocidas por diferentes autores (Bakker *et al.*, 2004). Un claro ejemplo es el género *Paxillus*, en el que *Paxillus albidulus* (Šutara, 1992) de la República Checa es cuestionada como especie por poder tratarse de un fenotipo sin pigmentos de *P. involutus* como los encontrados en Inglaterra (Vellinga *et al.*, 2012).

La utilización de herramientas de biología molecular ha permitido en los últimos años una mejor interpretación de la diversidad y la identificación de los hongos ectomicorrícicos. Actualmente la identificación se está resolviendo mediante el análisis filogenético de las secuencias de las regiones ITS. La elaboración de filogenias a partir de estas secuencias, puede ayudar a resolver la clasificación infragenérica y proporcionar pistas sobre la evolución de los caracteres morfológicos (Hibbett *et al.*, 1997), y la especificidad con el hospedador (Kretzer *et al.*, 1996). Siguiendo con el ejemplo del género *Paxillus* la utilización de estas técnicas permitió observar en diferentes trabajos (Hedh *et al.*, 2008; Vellinga *et al.*, 2012; Jargeat *et al.*, 2014) que la gran diversidad en comportamiento, hospedador y distribución geográfica encontrada en la especie *P. involutus*, era en realidad debido a que se trataban de 5 especies diferentes (*P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *P. involutus*, *P. obscurusporus* y *P. vernalis*), extremadamente difíciles de diferenciar mediante caracteres macro o micromorfológicos. La capacidad de diferenciar no solo la especie sino la posición que ocupa una determinada cepa dentro de la diversidad de la especie puede resultar crucial a la hora de entender su comportamiento en un ecosistema natural.

Adicionalmente y como método rápido y económico de comprobación de especies, son muy empleados los marcadores moleculares tipo ITS-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica consiste en que una vez amplificada la región ITS, ésta es digerida por 2 o 3 enzimas de restricción consiguiéndose en muchos casos un patrón de bandas claro e identificativo de la especie. De esta manera una vez identificada claramente la especie, estos marcadores nos permitirían validar los sucesivos pasos de aislamiento, cultivo e inoculación, de las diferentes especies, asegurándonos en todo momento la persistencia de la especie de interés.

Con todo ello, el objetivo de esta parte del trabajo fue la identificación y el estudio filogenético de los diferentes hongos ectomicorrícicos (cuerpos fructíferos y morfotipos) asociadas a *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra* encontradas en dos de los emplazamientos (Nitrastur y El Terronal) y determinar con mayor precisión la especie, variedad o cepa a la que pertenecen, así como la elaboración de patrones de ITS-RFLP para su posterior seguimiento.

5.2. Material y Métodos

5.2.1. Muestreo

Del total de especies fúngicas recolectadas, se seleccionaron aquellas ectomicorrícicas asociadas a *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea*, o *Populus nigra* (Tabla 5.1.):

Tabla 5.1.: Muestras analizadas de las que se consiguió la extracción y secuenciación del ITS.

Especie	Localización	Tipo de muestra
Basidiomycetes		
<i>Amanita muscaria</i>	El Terronal	Esporocarpio
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	Nitrastur	Esporocarpio
<i>Inocybe dulcamara</i>	Nitrastur	Esporocarpio
	El Terronal	Esporocarpio
<i>Lactarius pubescens</i>	Nitrastur	Esporocarpio
	El Terronal	Esporocarpio
<i>Leccinum scabrum</i>	Nitrastur	Esporocarpio
<i>Paxillus ammonivirescens</i>	Nitrastur	Esporocarpio
	LOCSA	Micelio
	Siero	Esporocarpio
<i>Paxillus cuprinus</i>	Nitrastur	Esporocarpio
<i>Scleroderma citrinum</i>	Nitrastur	Raíz
<i>Scleroderma bovista</i>	Nitrastur	Raíz
<i>Tricholoma cingulatum</i>	Nitrastur	Esporocarpio
	El Terronal	Esporocarpio
<i>Tricholoma fulvum</i>	Nitrastur	Esporocarpio
	El Terronal	Esporocarpio
Ascomycetes		
Helotial	Nitrastur	Raíz
<i>Melionomyces</i> sp.	Nitrastur	Raíz

Las especies que no se encuentran presentes en esta tabla asociadas a *B. celtiberica*, *S. atrocinerea*, o *P. nigra* no se analizaron, bien por el mal estado de las muestras, o porque no se disponía de la suficiente cantidad de muestra tras realizar los análisis de contenido de metales (Capítulo 3). En el caso de las muestras procedentes de raíz se utilizaron las secuencias obtenidas en el Capítulo 4. Además incluimos un ejemplar de *P. ammonivirescens* de una zona no contaminada del concejo de Siero.

5.2.2. Extracción de ADN genómico de cuerpos fructíferos

Las muestras de esporocarpio se recogieron, tal como se describe en el Capítulo 3, de tejidos internos no expuestos al exterior, y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Para la extracción del ADN genómico, se homogeneizaron entre 100-200 mg de muestra con ayuda de mortero y utilizando N líquido. El ADN se extrajo mediante el kit *DNeasy Plant Mini Kit* de Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante.

La cantidad de ADN genómico extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio) empleando un sistema Gel Logic 100 (KODAK) y el programa informático KODAK 1D Image Analysis.

5.2.3. Extracción de ADN genómico de micelio

Para el caso de *P. ammonivirescens* procedente de la LOCSA (Pa L), las muestras proceden de micelio crecido en medio MMN (Marx, 1969) durante 8 semanas. Tras este

tiempo se recogieron de 100 a 200 mg de micelio que se almacenó a -80 °C hasta su análisis. La homogeneización, extracción y cuantificación se realizaron de la misma manera que la descrita anteriormente.

5.2.4. Amplificación y análisis de regiones ITS

Al igual que en el Capítulo 4, se amplificó la región ITS constituida por ITS 1, ITS 2 y el 5.8S rRNA utilizando las parejas de cebadores ITS 1 e ITS 4 (Tabla 5.2.).

Tabla 5.2.: Cebadores utilizados en la amplificación de la región ITS mediante PCR, con sus respectivas secuencias de bases y la procedencia de los mismos. F y R indican los cebadores *forward* y *reverse* respectivamente.

Región	Cebador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS	ITS 1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS 4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Las amplificaciones se realizaron en reacciones de 25 µL de volumen final con 10 ng de ADN, 2,5 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 1 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,5 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,5 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,1 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 40 s, anillamiento a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1,50 min durante 30 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min. En el caso de no conseguir ningún tipo de amplificación con el protocolo de PCR anteriormente descrito, se utilizó el descrito por Hedh *et al.* (2008). Las amplificaciones en este protocolo se realizaron en reacciones de 20 µL de volumen final con 10 ng de ADN, 2 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,4 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,4 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,08 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 7 min, seguido de una desnaturalización a 94°C durante 30 s, anillamiento a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2,30 min durante 35 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min.

Por último se llevo a cabo la purificación del producto de PCR resultante, mediante el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* de Macherey-Nagel® siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación de las regiones amplificadas se llevó a cabo a través de un servicio externo, Stab Vida®, utilizando los mismos cebadores usados en la amplificación y bajo condiciones de terminación BigDye™. Posteriormente la lectura se realizó en un secuenciador automático ABI 3730 XL y utilizando el sistema LongTrac, también a través de la misma empresa. Las secuencias *forward* y *reverse*, o los fragmentos obtenidos tras el corte con las endonucleasas de cada morfotipo fueros analizadas, corregidas las indeterminaciones y alineadas mediante el programa Geneious Pro 4.8.2., generando una secuencia consenso de mayor calidad.

5.2.4.1. Estructura del ITS1 de *Leccinum* y localización de minisatélites

Una de las características del género *Leccinum* es su gran heterogeneidad en la longitud de la región ITS1, debido a la repetición de 2 secuencias de minisatélites repetidas en tándem (CTATTGAAAAG y CTAATAGAAG). Estos minisatélites se repiten entre 12 y 36 veces; habiendo menor número de repeticiones entre individuos de una misma especie que entre especies. Para visualizar la variación de la longitud entre especies se utilizó el programa Geneious Pro 4.8.2., que se utilizó también para buscar el número de repeticiones de los minisatélites.

5.2.5. Análisis filogenéticos

En primer lugar con las secuencias obtenidas se realizó un BLAST (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) para compararlas con las secuencias disponibles en el GenBank (NCBI, Altschul *et al.*, 1997) e identificarlas provisionalmente antes de los análisis filogenéticos. Debido al elevado número de especies presentes en algunos de los géneros analizados, se decidió estudiar el subgénero, sección o clase a la que pertenecen las especies encontradas (Tabla 5.3.), con especial atención a las especies con distribución Europea. Todas las secuencias del GenBank utilizadas se encuentran en el Apéndice 4, señalando ubicación geográfica, posible hospedador y autor. En el caso de la secuencia del Helotial encontrado en las raíces de abedul se revisaron los 100 primeros resultados obtenidos en el BLAST, seleccionando todas las especies identificadas así como las no identificadas que presentaban un *Blast score* = 0.0 y un *Query coverage* = 99%.

Las secuencias se alinearon utilizando el programa de alineamiento múltiple MUSCLE v3.7 (Edgar, 2004). Los alineamientos obtenidos se corrigieron de forma manual utilizando el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Las ambigüedades presentes en las secuencias fueron sustituidas por los símbolos del código internacional de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

El análisis filogenético de estas regiones se efectuó con el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) mediante los métodos de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood (ML)) y de distancias basados en algoritmos de agrupamiento (Neighbor-Joining (N-J)), y con el programa MrBayes v3.2.2. (Ronquist *et al.*, 2012) para el cálculo de la inferencia Bayesiana. El modelo evolutivo para cada especie se seleccionó utilizando el programa jModelTest-2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012), siguiendo el criterio de Akaike (AIC (Akaike, 1974)), tal como se muestra en la Tabla 5.3.

Para los análisis de ML y N-J se realizó una búsqueda exhaustiva del mejor árbol filogenético entre 10.000 aleatorizaciones de las muestras realizadas mediante “*bootstrap*”. Para el cálculo de la inferencia bayesiana se ejecutó un *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) con cuatro cadenas simultáneas. El número total de generaciones analizadas para cada especie se indica en la Tabla 5.3., de manera que en cada caso la razón de verosimilitud fuera inferior a 0,01. Se muestreó cada 1000 generaciones, mostrando la razón de verosimilitud cada 5000. En cada caso se han descartado el 25% de los primeros árboles generados como *burn-in*, calculando la probabilidad posterior con los restantes. La visualización de los árboles obtenidos se llevó a cabo mediante el software FigTree v1.4.1.

Tabla 5.3.: Se muestra el género, subgénero, sección, clase o complejo utilizado para su análisis filogenético. **Nº** indica el número de total de secuencias analizadas, **V** indica el número de sitios variable en el alineamiento, **Long.** Indica el número de pares de bases del total de las secuencias desde la menor a la mayor, **Long Alin.** Indica la longitud total del alineamiento con GAPS, **Modelo** indica que modelo evolutivo se utilizó en cada caso, **AIC** valor obtenido utilizando el criterio de Akaike para la selección del modelo, **Generaciones** indica el número de generaciones totales utilizadas en cada caso para que la razón de verosimilitud fuera inferior a 0,01.

Género	Nº	V	Long. (bp)	Long Alin. (bp)	Modelo	AIC	Generaciones
Basidiomycetes							
<i>Amanita</i> Sección <i>Amanita</i>	38	263	525/656	719	GTR+G*	5772.2288	3.000.000
<i>Hebeloma</i>	63	152	535/555	579	GTR+I+G	5686.8571	2.000.000
<i>Inocybe</i> Subgénero <i>Mallocybe</i>	19	206	538/611	670	HKY+I+G*	4849.9645	1.000.000
<i>Lactarius</i> Subgénero <i>Piperites</i>	45	136	291/320	349	HKY+I+G	4337.8834	2.000.000
<i>Leccinum</i>	36	482	375/1249	1589	TrN+G*	11747.2139	1.000.000
<i>Paxillus</i>	79	66	488/513	524	TrN+G	2656.9320	2.000.000
<i>Scleroderma</i>	53	240	372/447	511	TrN+G	6350.7522	1.000.000
<i>Tricholoma</i> Sección <i>Albobrunnea</i> Sección <i>Terrea</i>	33	264	516/558	641	TrN+I+G	5956.2786	1.000.000
Ascomycetes							
Helotiales	63	283	367/437	498	GTR+I+G	15924.3417	11.000.000
Familias Hyalocyphaceae-Heloticeae	28	168	395/409	429	GTR+G	3901.1293	1.000.000
Complejo <i>Meliniomyces-Rhizoscyphus</i>	61	149	406/442	470	GTR+G	4489.9908	3.000.000

* HKY, Hasegawa-Kishiro-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985); GTR, *general time reversible* (Tavaré, 1986); TrN, Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993); I: proporción de sitios invariables; G: parámetro de la distribución gamma.

5.2.6. ITS-RFLP

Adicionalmente, con el fin de obtener una base de datos interna que nos permitiera una rápida identificación de especies, se realizó el análisis de RFLP de las regiones ITS previamente amplificadas de las especies procedentes de esporcarpo y micelio.

Para ello se digirieron 20 µl del ADN amplificado con 20 unidades de las endonucleasas Eco-RI (Sigma), Hae III (Invitrogen) y Hinf II (Takara), durante 4 horas a 37 °C siguiendo el protocolo del fabricante en un volumen final de 30 µl.

Tras la digestión, los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (2% y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio) empleando un sistema Gel Logic 100 (KODAK). Utilizando el marcador HyperLadder 100 bp (Bioline) y el programa informático KODAK 1D Image Analysis se determinó el tamaño de cada fragmento.

5.3. Resultados

Se presentan en primer lugar los resultados obtenidos para los Basidiomycetes y en segundo el de los Ascomycetes.

5.3.1. *Amanita*

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.1.), de distancias basados en algoritmos de agrupamiento (Fig.5.2.) y con el cálculo de la inferencia bayesiana (Fig.5.3.), ubican a nuestra especie de estudio como *Amanita muscaria*. Los especímenes de esta especie, dentro de los árboles generados mediante los 3 métodos, se separan en 3 clados; uno constituido por las muestras procedentes de Japón, Nueva Zelanda, Polonia e Inglaterra, donde se agrupa nuestra especie, otro con todas las muestras procedentes de EEUU y un tercer clado con los especímenes de la variedad *regalis* procedentes de Japón y Noruega.

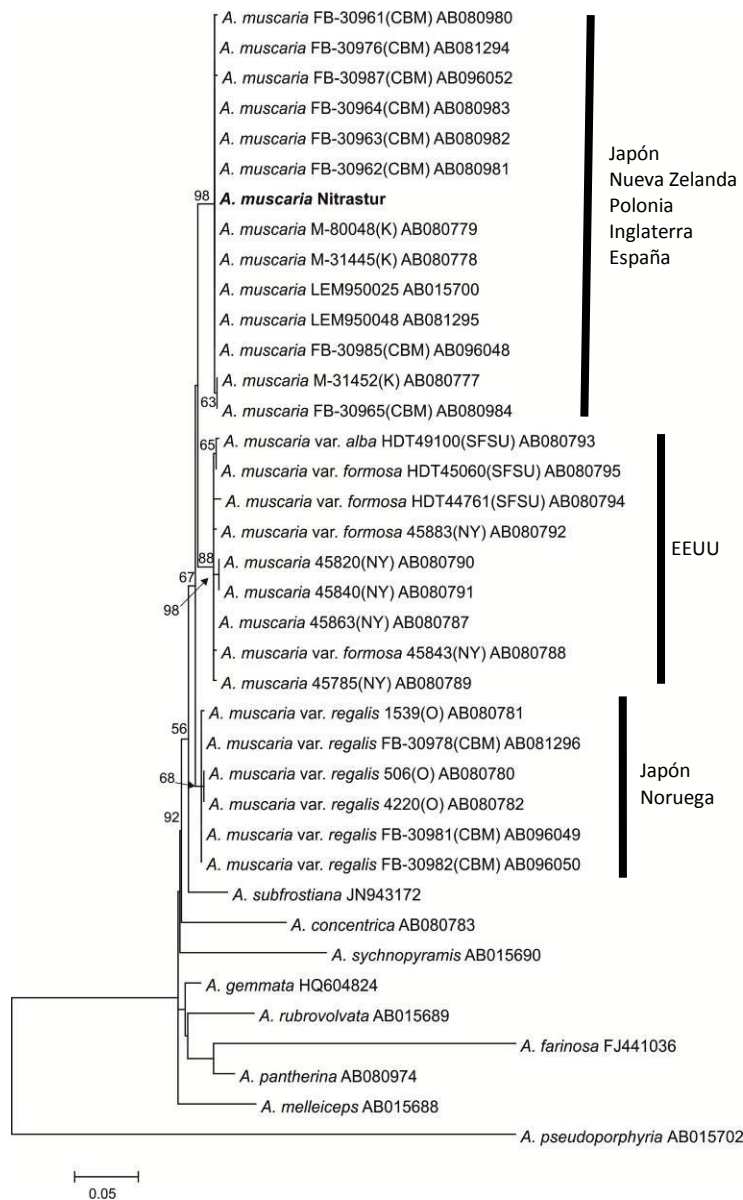


Fig.5.1.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Amanita* sección *Amanita* mediante ML. Grupo externo *A. pseudoporphyria* de la sección *Phalloideae*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

Aunque con una topología similar, se observa una variación de la relación de estos 3 clados con el resto de especies relacionadas, dependiendo de la metodología utilizada dentro del subgénero *Amanita*.

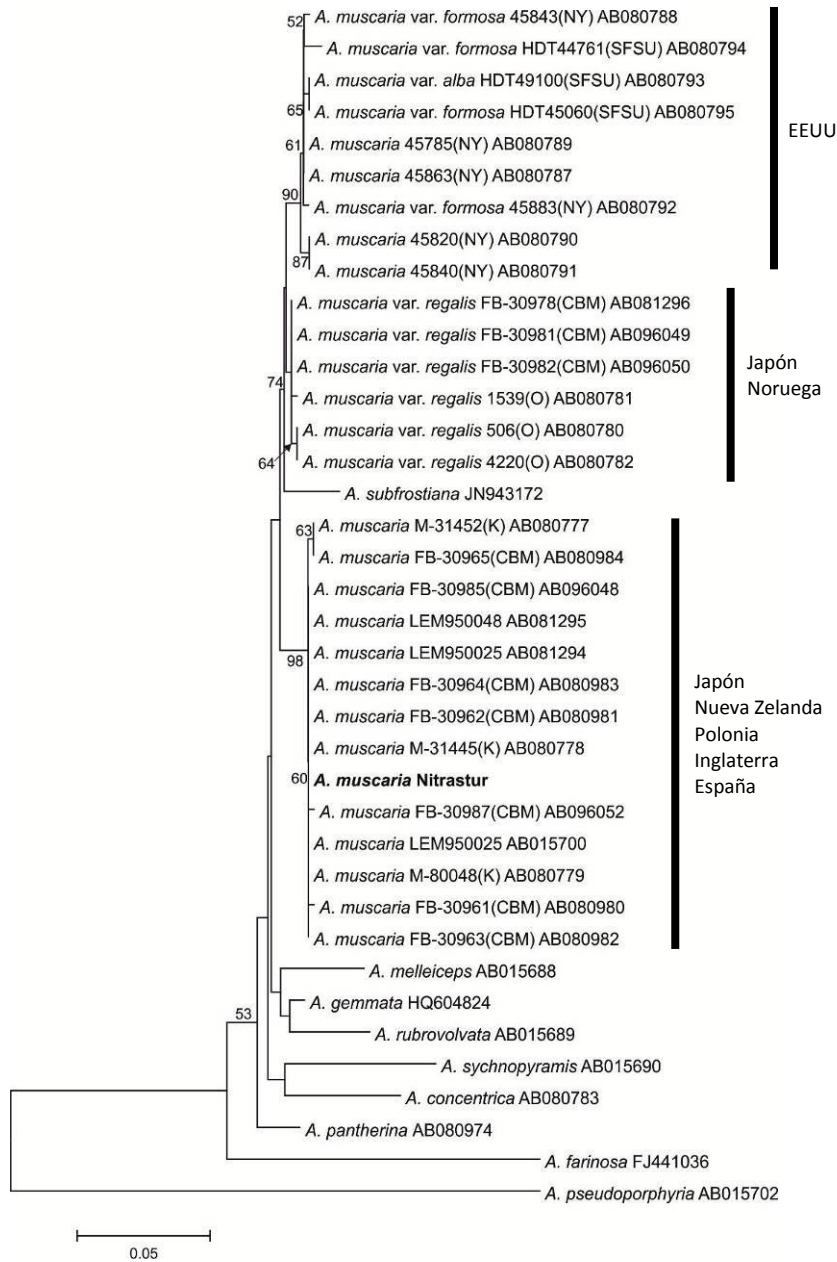


Fig.5.2.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Amanita* sección *Amanita* N-J. Grupo externo *A. pseudoporphyria* de la sección *Phalloideae*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

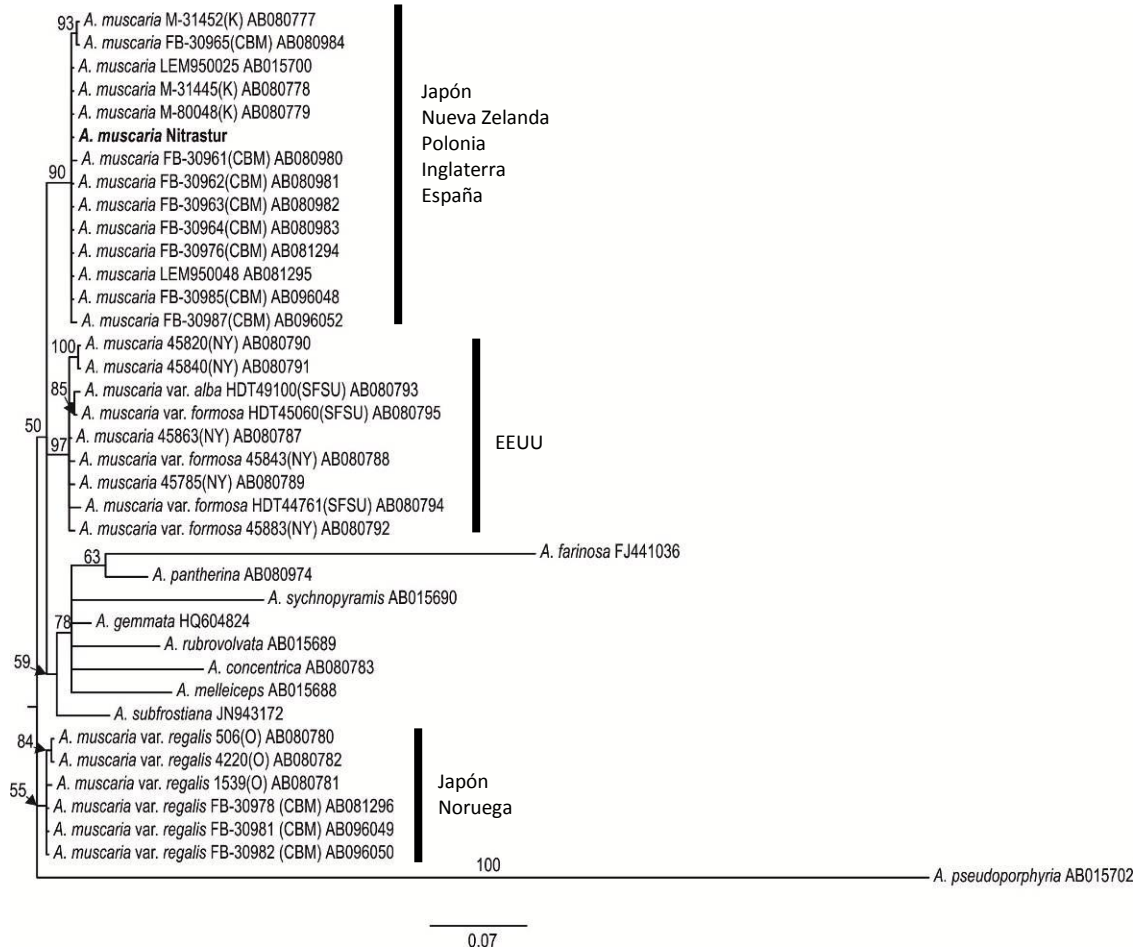


Fig.5.3.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Amanita* sección *Amanita* mediante MB. Grupo externo *A. pseudoporphyria* de la sección *Phalloideae*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.4. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *A. muscaria* tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I.

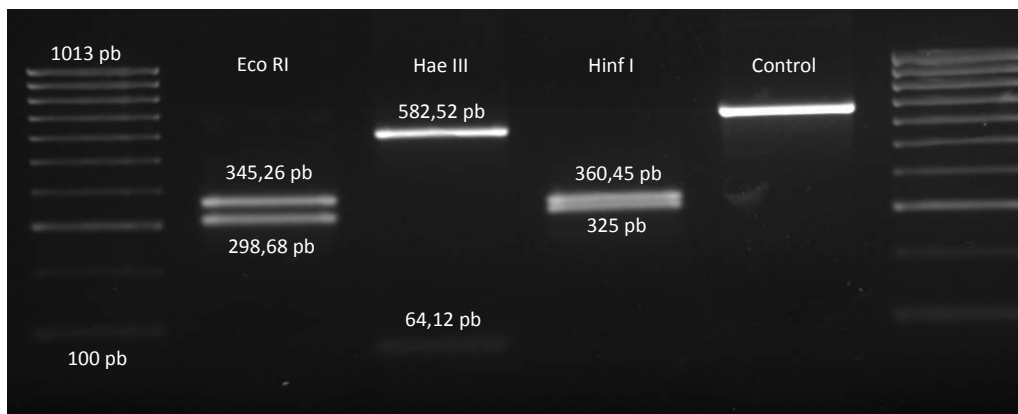


Fig.5.4.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para *A. muscaria* de El Terronal tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.2. *Hebeloma*

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.5.), de distancias (Fig.5.6.), y con el cálculo de la inferencia bayesiana (Fig.5.7.), ubican a nuestra especie de estudio dentro de la sección *Indusiata*. Si bien difiere de la mayoría de las secuencias de *H. mesophaeum*, se encuentra muy próxima a ellas al igual que a *H. malenconii*, *H. sordidum* o *H. pallidum* especies prácticamente indistinguibles macro y microscópicamente.

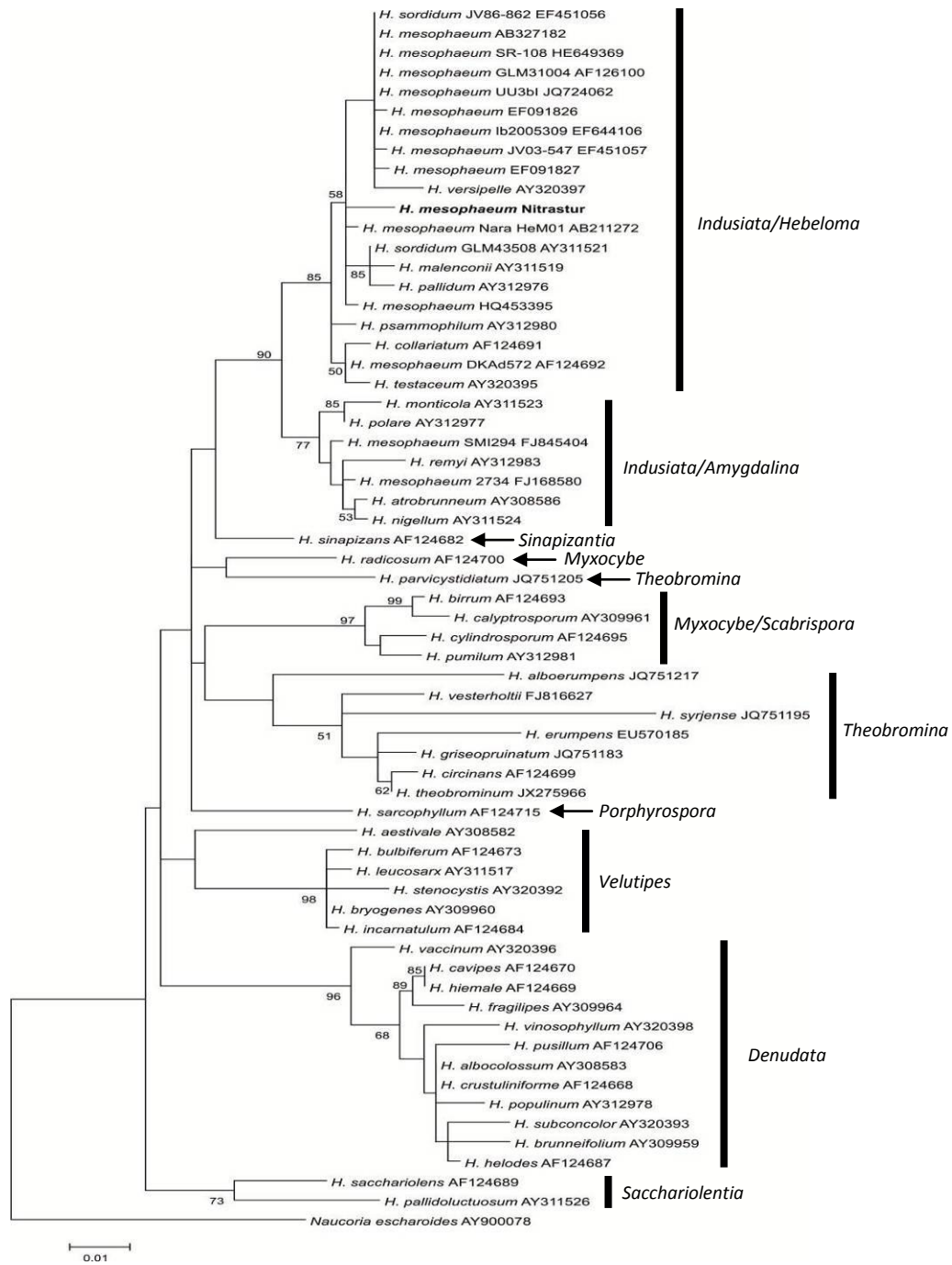


Fig.5.5.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hebeloma* mediante ML. Grupo externo *Naucoria escharoides*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

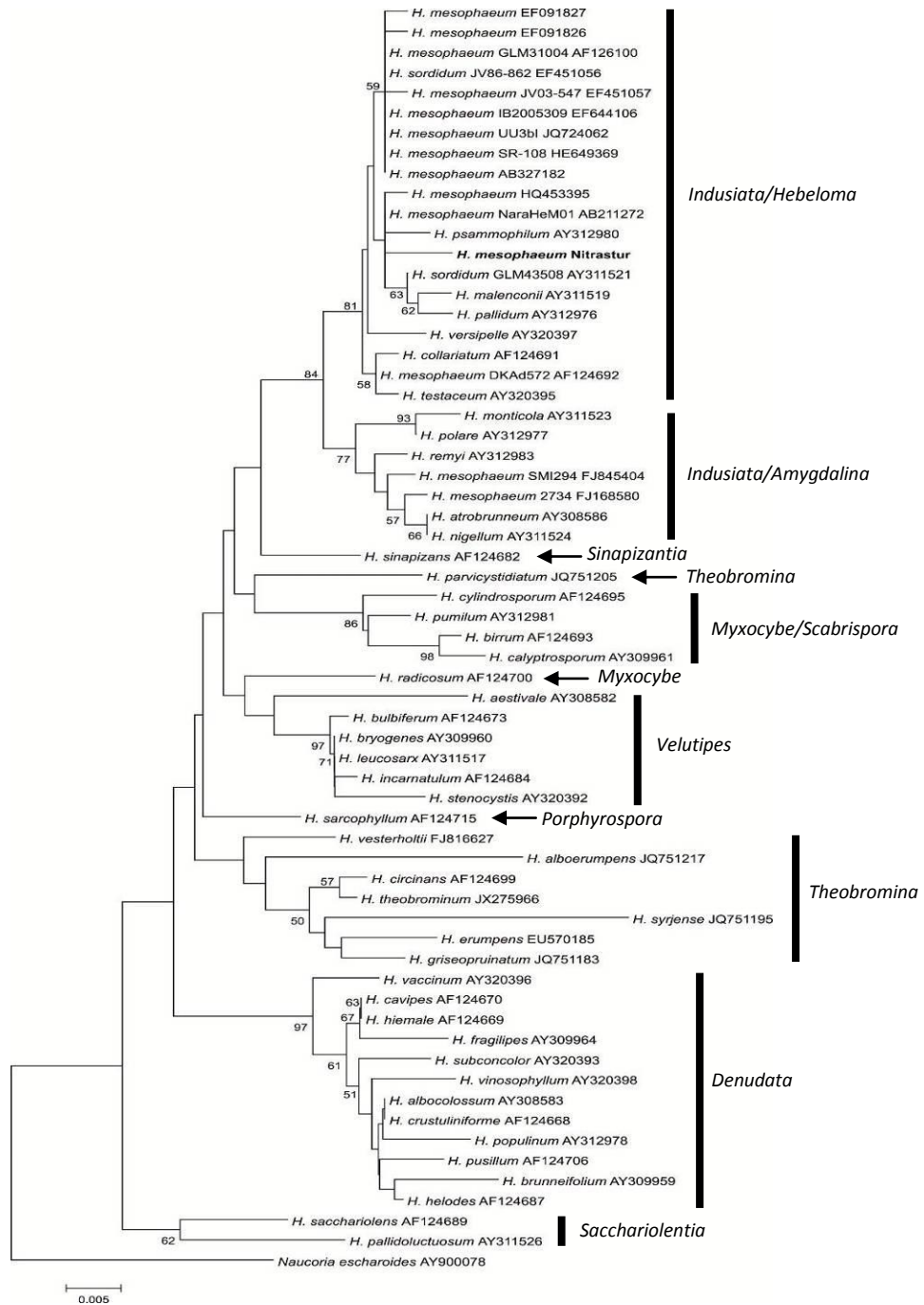


Fig.5.6.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hebeloma* mediante N-J. Grupo externo *Naucoria escharoides*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

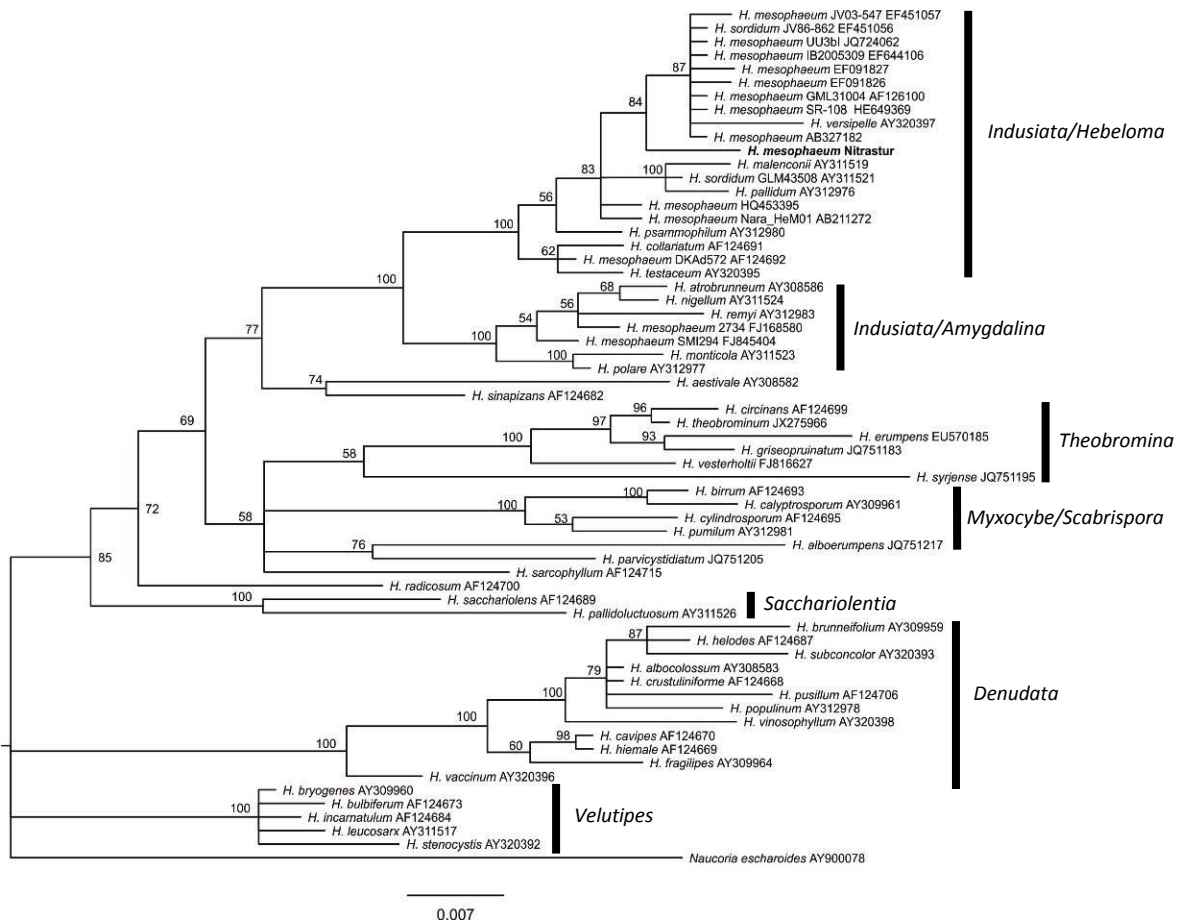


Fig.5.7.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hebeloma* mediante MB. Grupo externo *Naucoria escharoides*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.8. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para nuestra muestra de *H. mesophaeum* tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. Hinf I.

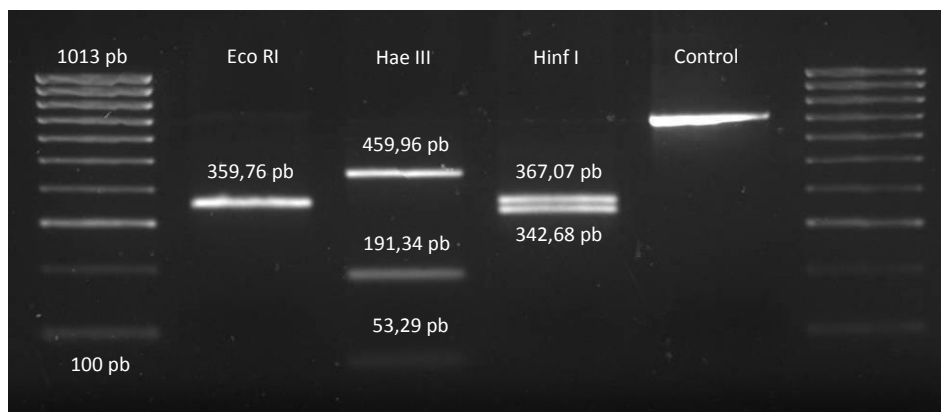


Fig.5.8.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para *H. mesophaeum* de Nitrastur tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.3. *Inocybe*

Los árboles resultantes de los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.9.), de distancias (Fig.5.10.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.11.) muestran la misma topología separando 4 subgrupos dentro del clado, agrupándose las muestras de ambos emplazamiento con otras muestra de *I. dulcamara* procedente de Escandinavia.

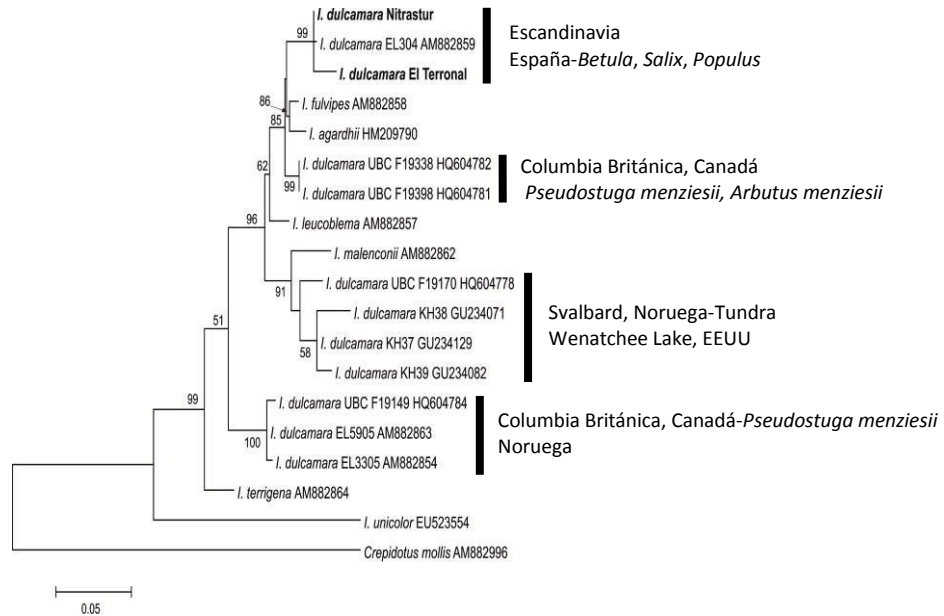


Fig.5.9.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Inocybe* subgénero *Malloocybe* mediante ML. Grupo externo *Crepidotus mollis*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

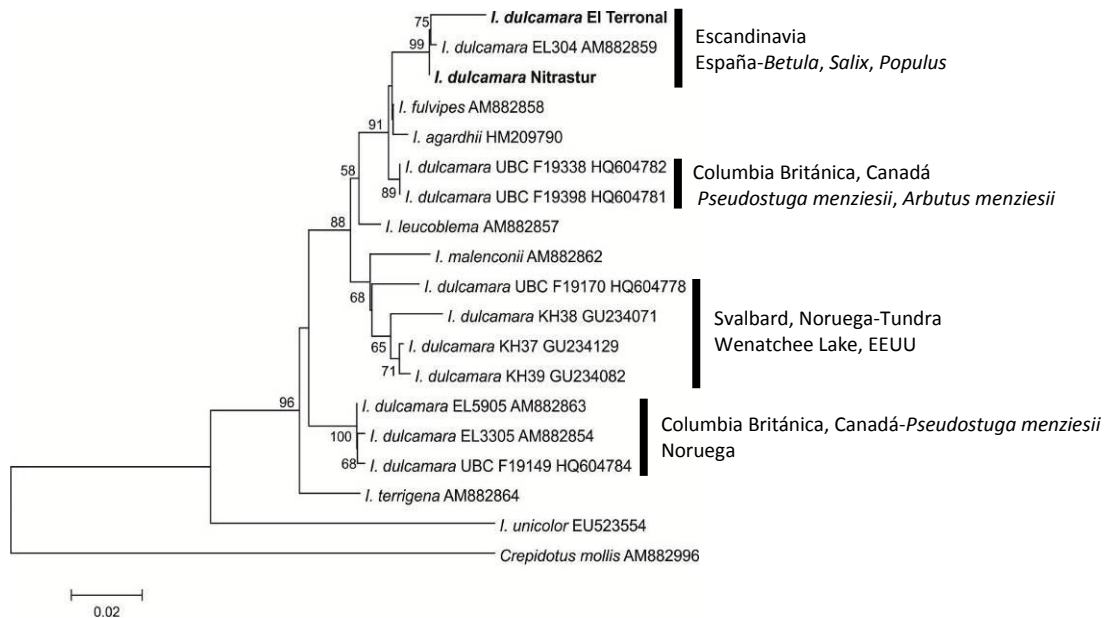


Fig.5.10.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Inocybe* subgénero *Malloocybe* mediante N-J. Grupo externo *Crepidotus mollis*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

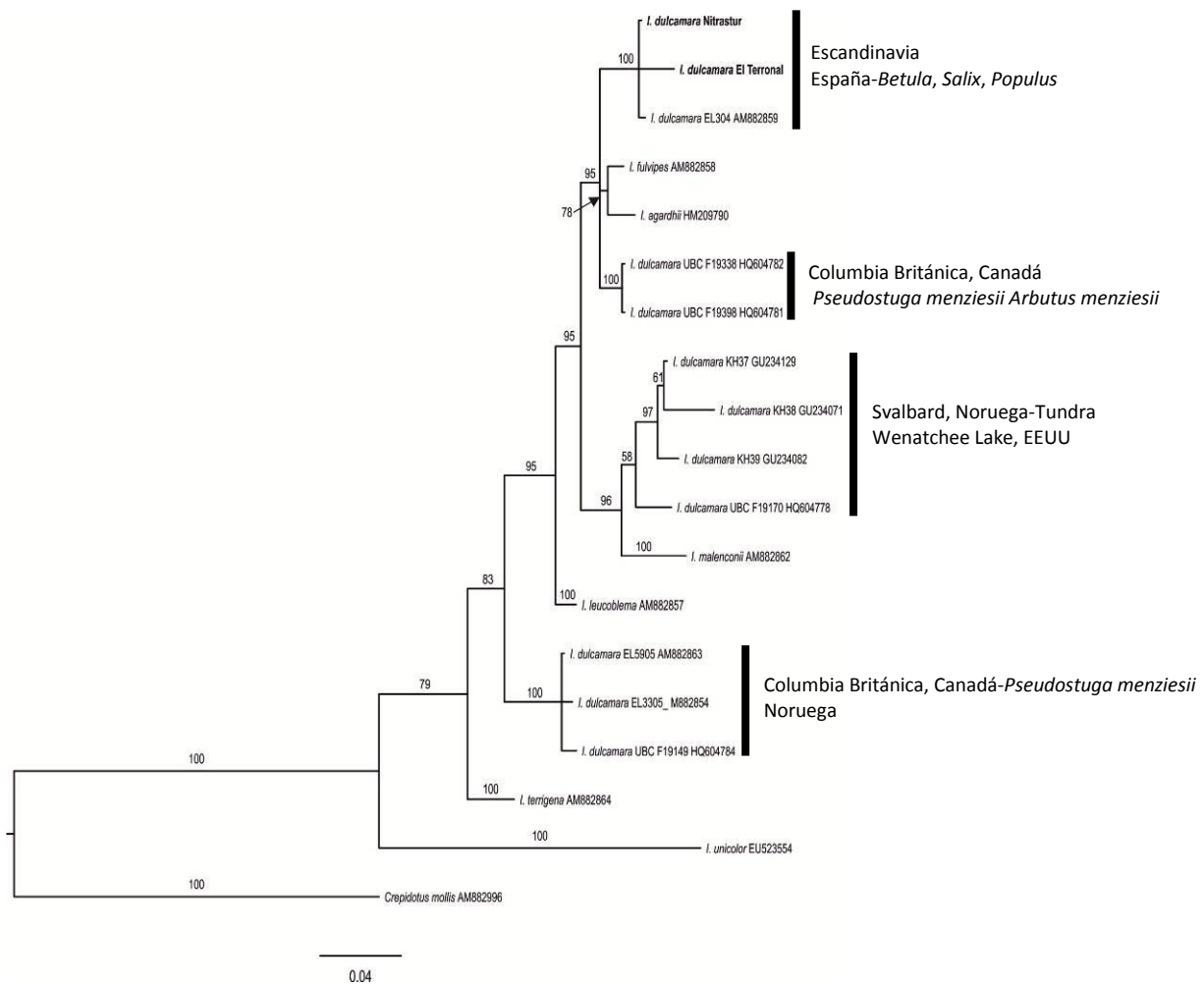


Fig.5.11.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Inocybe* subgénero *Mallocybe* mediante MB. Grupo externo *Crepidotus mollis*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.12. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *I. dulcamara* tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. Este patrón se repite en las muestras obtenidas en los emplazamientos de Nitrastur y El Terronal.

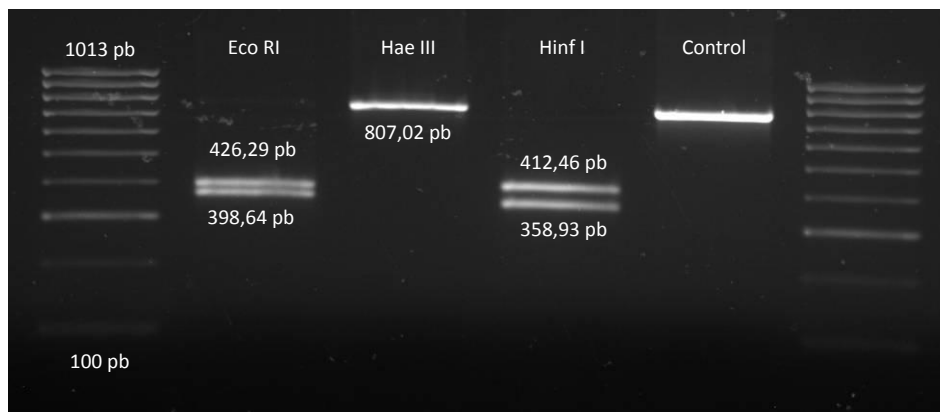


Fig.5.12.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para *I. dulcamara* de El Terronal tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.4. *Lactarius*

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de de máxima probabilidad (Fig.5.13.), de distancias (Fig.5.14.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.15.), aunque mostrando topologías diferentes, ubican a las muestras de *Lactarius* de Nitrastur y El Terronal como *L. pubescens*. Mientras que el ML y MB separan a *L. pubescens* como una clado bien diferenciado e íntimamente relacionado con *L. zonarioides*, el N-J agrupa a *L. pubescens* no solo con la citada especie sino con otras como *L. auriolla* y *L. aquizonatus* aunque con niveles de *bootstrap* inferiores al 50%. Adicionalmente mediante ML y MR parece existir un subgrupo dentro de *L. pubescens* constituido por las secuencias AY606953 y JQ888184, que en caso de N-J se separan del resto para agruparse con *L. citriolens*.

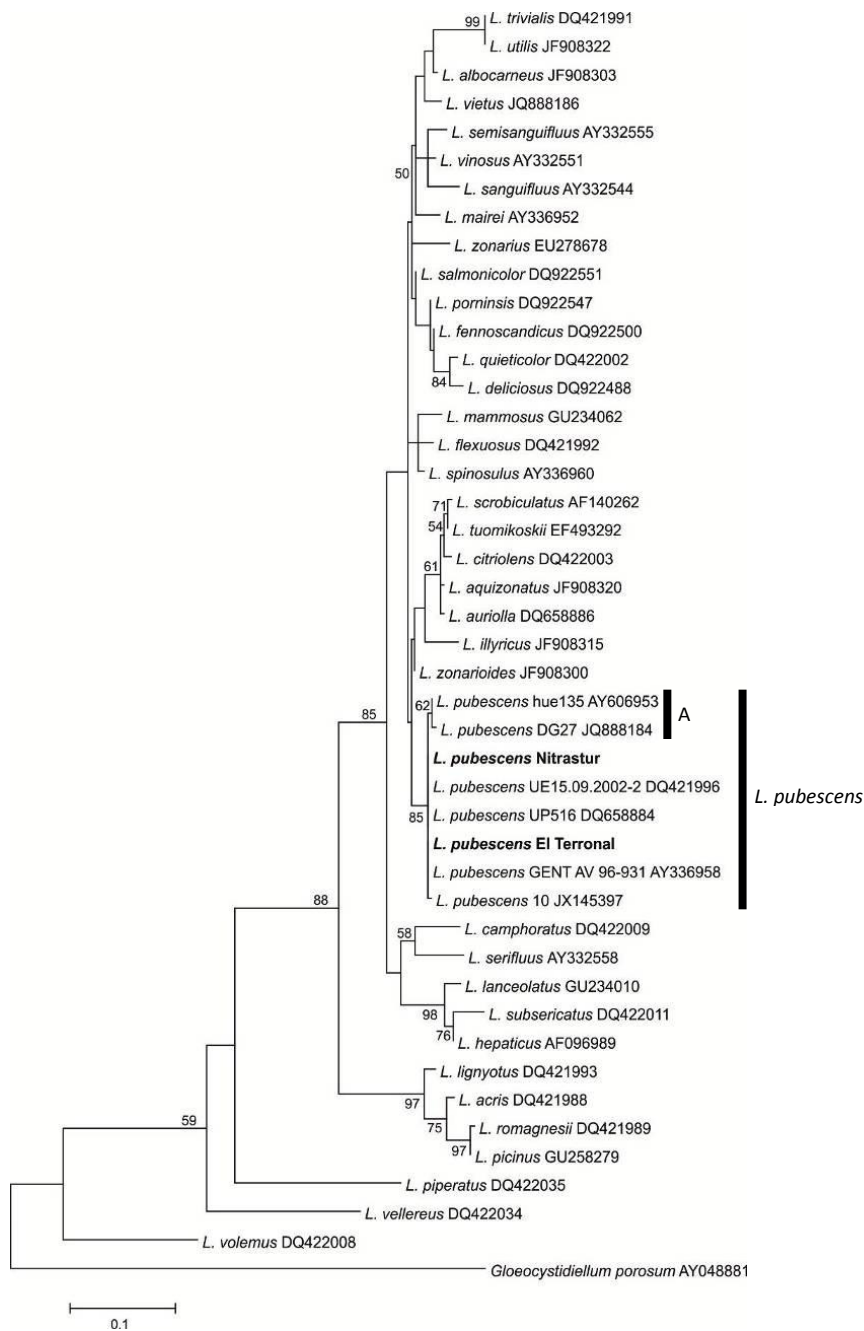


Fig.5.13.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Lactarius* subgénero *piperites* mediante máxima ML. Grupo externo *Gloeocystidiellum porosum*. **A** indica el subgrupo observado dentro del clado *L. pubescens*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

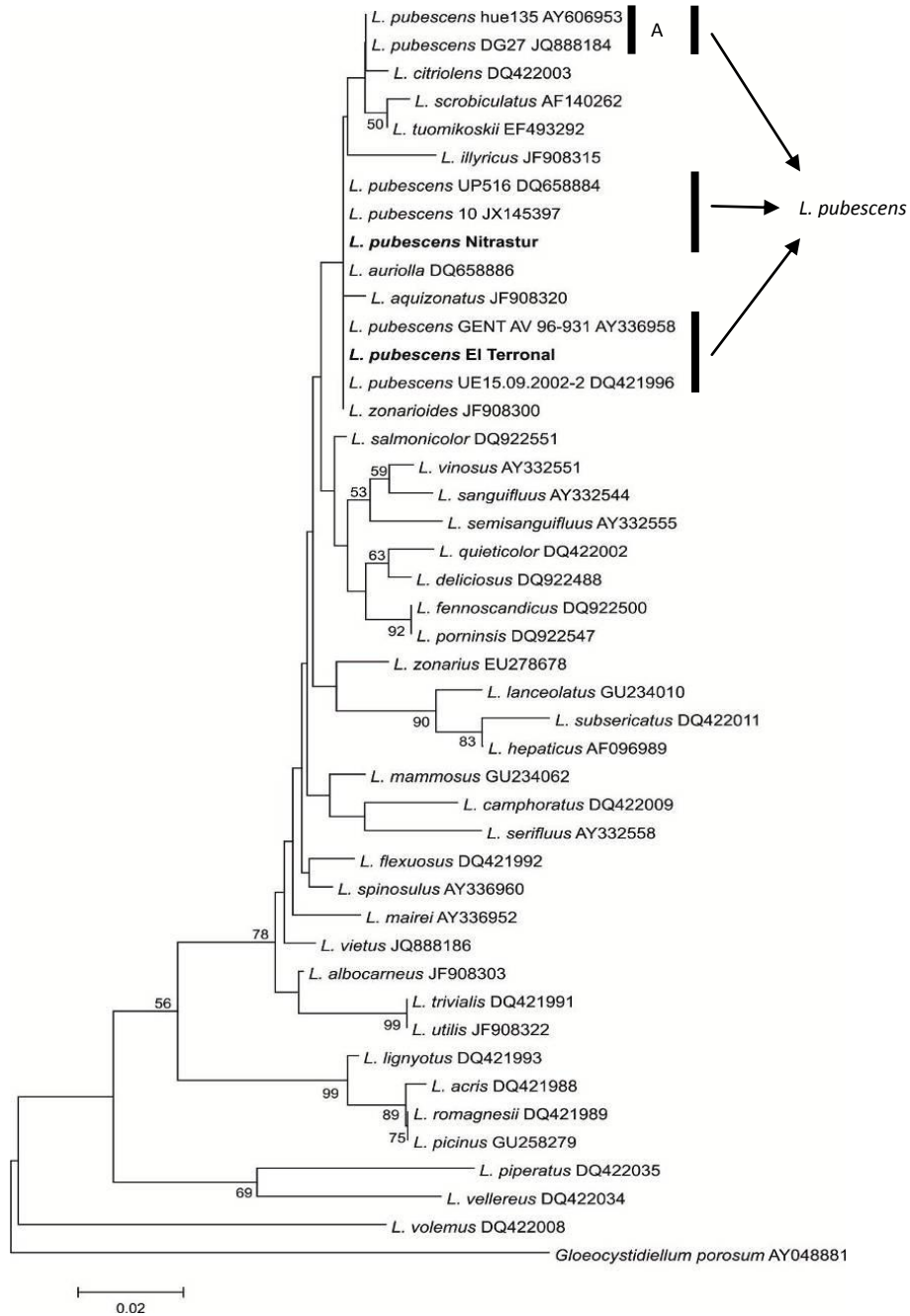


Fig.5.14.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Lactarius* subgénero *Piperites* mediante N-J. Grupo externo *Gloeocystidiellum porosum*. **A** indica el subgrupo observado dentro del clado *L. pubescens*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

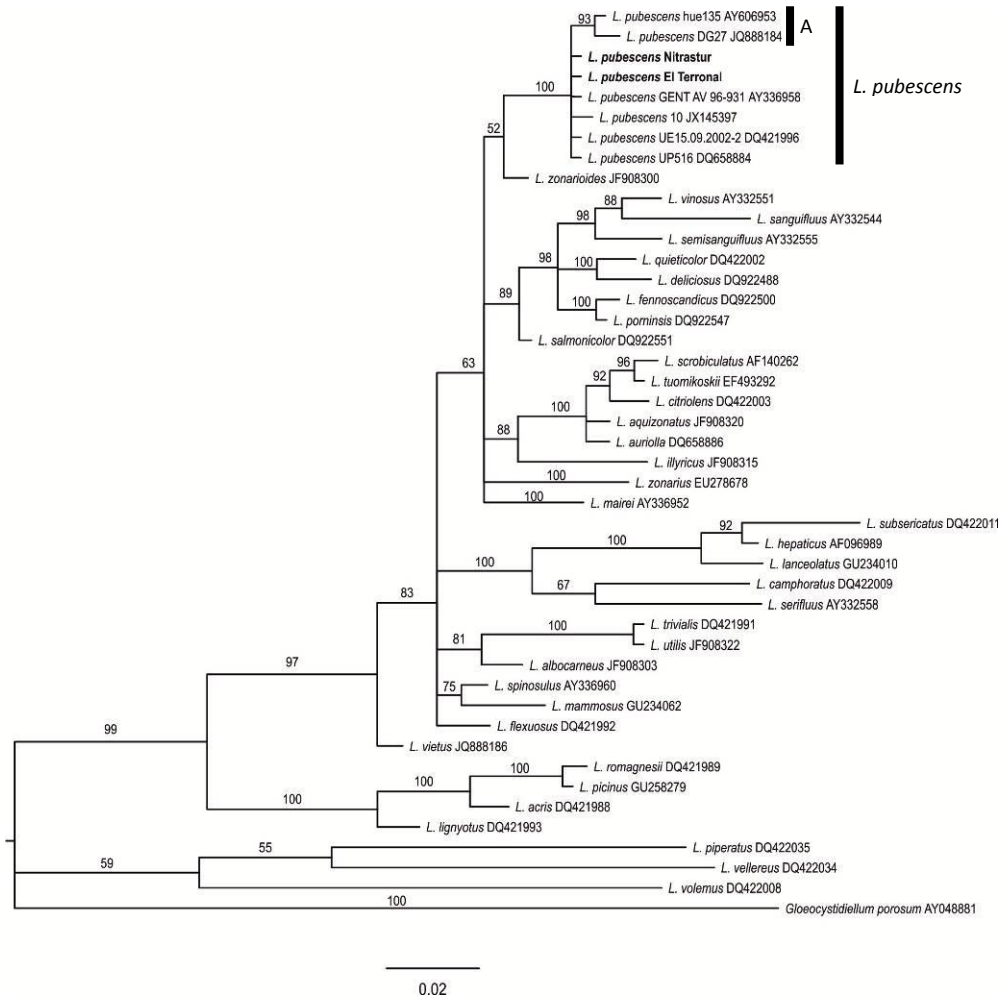


Fig.5.15.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Lactarius* subgénero *Piperites* mediante MB. Grupo externo *Gloeocystidiellum porosum*. A indica el subgrupo observado dentro del clado *L. pubescens*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.16. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *L. pubescens* tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. Este patrón se repite en las muestras obtenidas en los emplazamientos de Nitrastur y El Terronal.

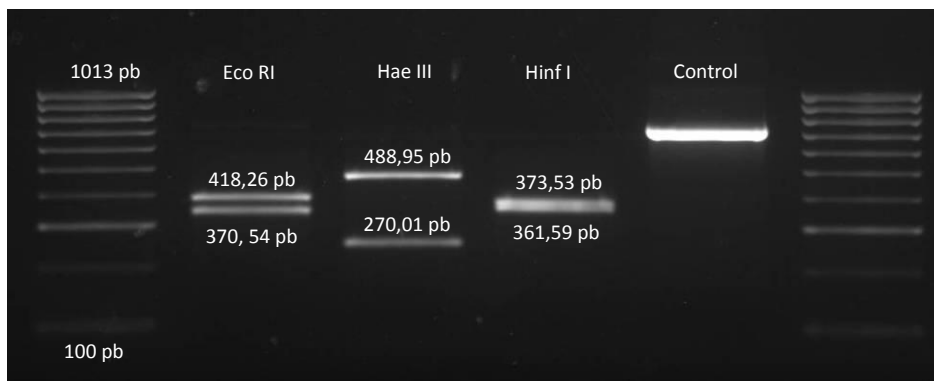


Fig.5.16.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para *L. pubescens* de Nitrastur tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.5. *Leccinum*

Visualizando el alineamiento de las secuencias de *Leccinum* (Fig.5.17.) se observa que nuestra muestra se asemeja a la secuencia AF454585 perteneciente a *L. scabrum* y a AF454584 perteneciente a *L. rigidipes*. En cuanto al número de repeticiones se han encontrado 6 de CTATTGAAAAG y 4 de CTAATAGAAG.

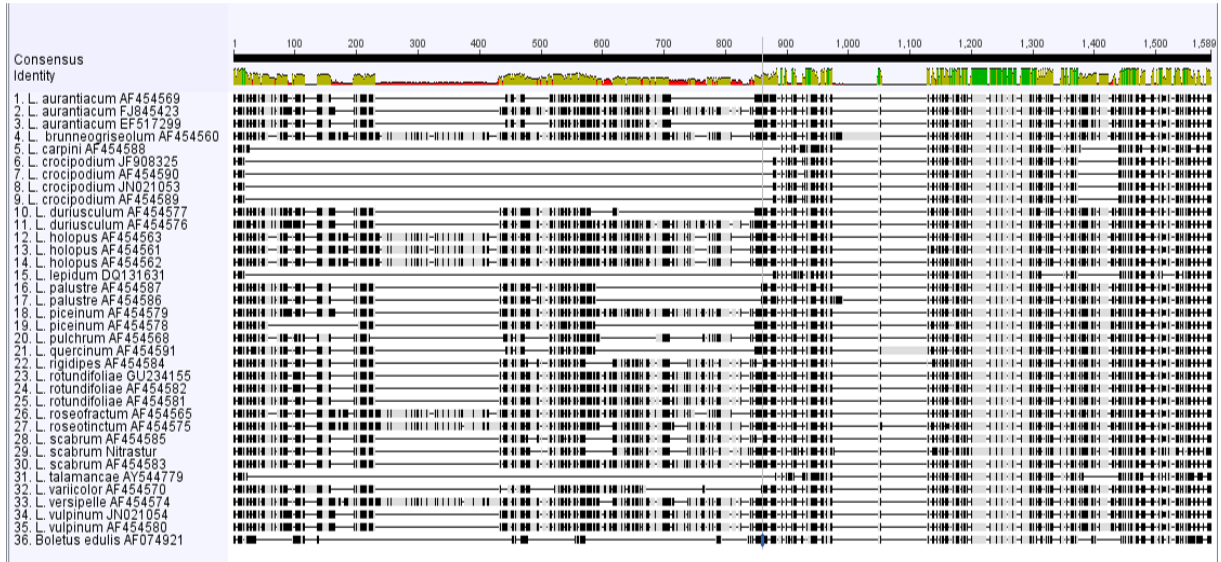


Fig.5.17.: Alineamiento de las secuencias de *Leccinum* en el programa Geneious Pro 4.8.2., mostrando la estructura diferencial del ITS1.

Los árboles obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.18.), de distancias (Fig.5.19.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.20.), muestran una topología diferente. Los métodos ML y MR agrupan nuestra muestra con las mismas secuencias citadas anteriormente (*L. scabrum* y *L. rigidipes*) separándolas de la otra secuencia de *L. scabrum* que se agrupa con *L. rotundifoliae*. Sin embargo el N-J no nos agrupa las especies en una posición clara.

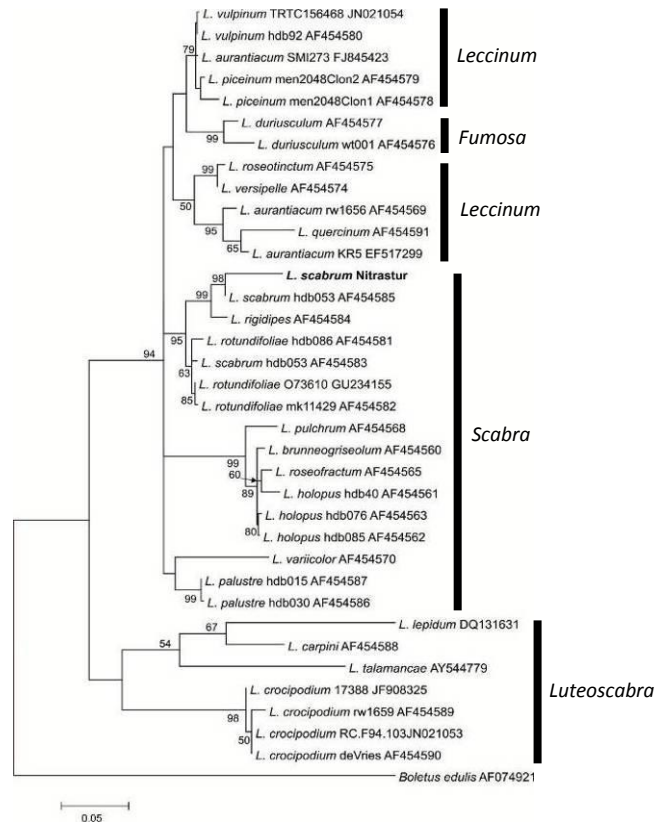


Fig.5.18.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Leccinum* mediante ML. Grupo externo *Boletus edulis*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

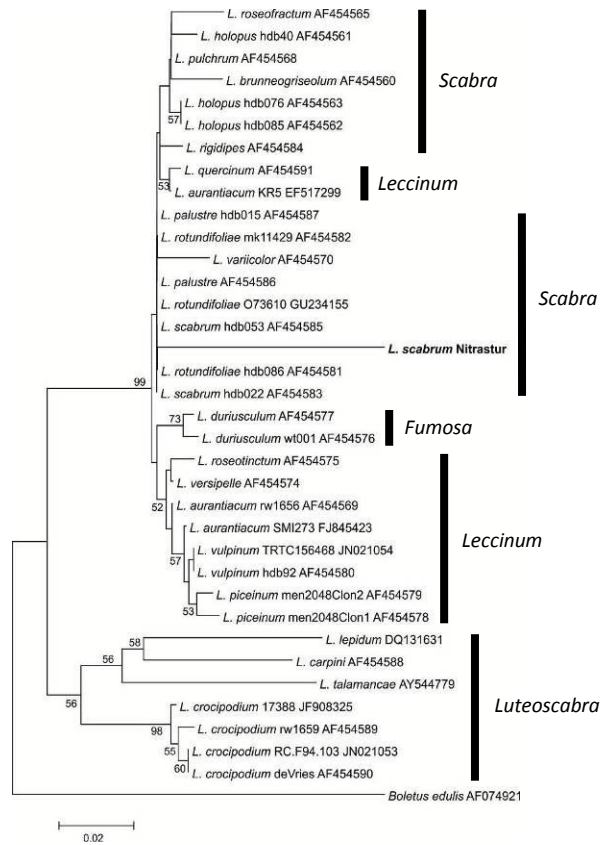


Fig.5.19.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Leccinum* mediante N-J. Grupo externo *Boletus edulis*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

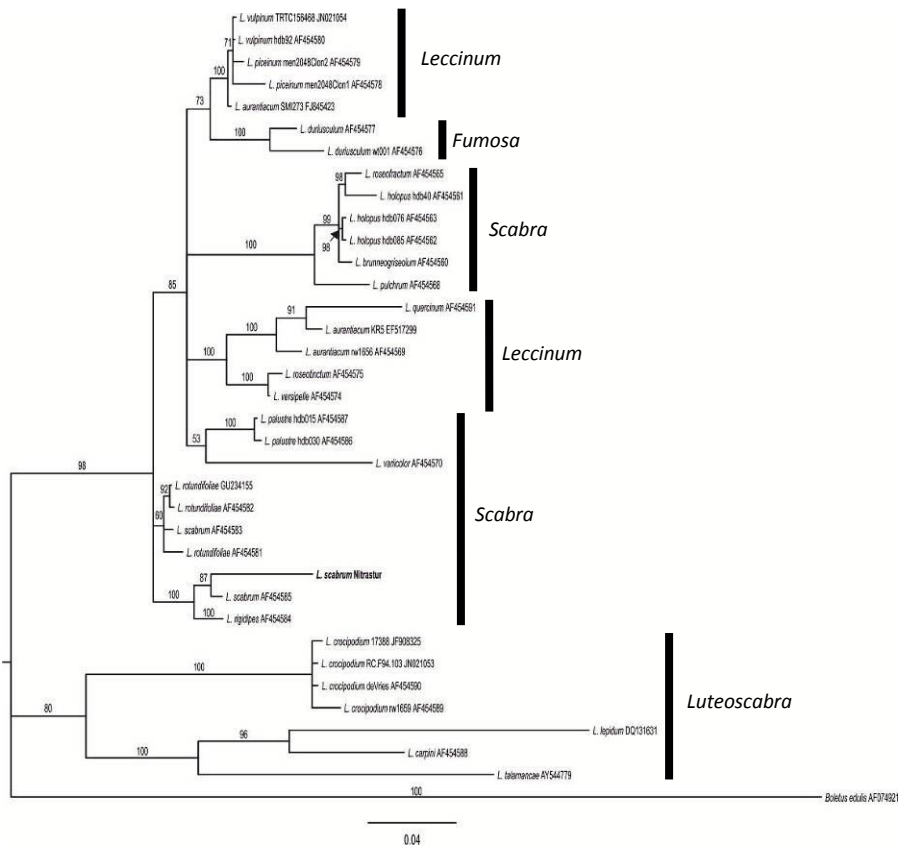


Fig. 5.20.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Leccinum* mediante MB. Grupo externo *Boletus edulis*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.21. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *L. scabrum* tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I.

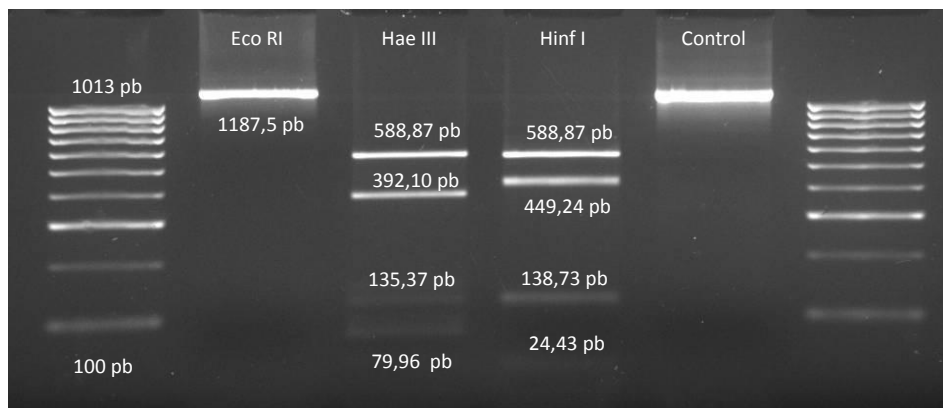


Fig. 5.21.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para *L. scabrum* de Nitrastur tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.6. *Paxillus*

Los árboles obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.22.), de distancias (Fig.5.23.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.24.), muestran la misma topología, ubicando las muestras de La carrera (Siero), la LOCSA y los ejemplares de Nitrastur de la Zona 9 como *P. ammoniavirescens*, mientras que los ejemplares de la zona 7 se enmarcan dentro de *P. cuprinus*. Analizando la agrupación de las secuencias parece que dentro de *P. ammoniavirescens* existe un subgrupo al igual que en *P. involutus*, que no parece ser achacable ni a la geografía ni al hospedador.

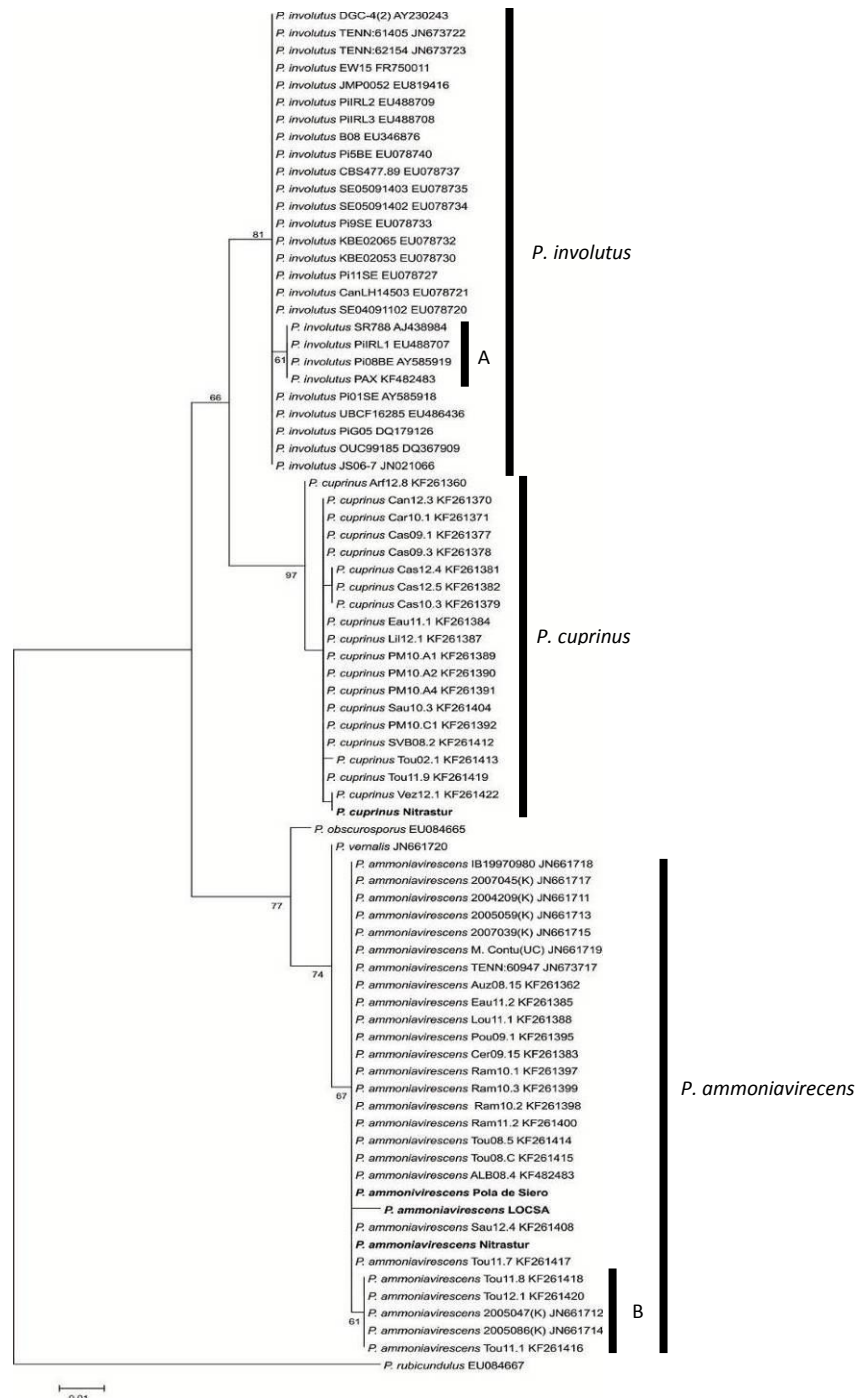


Fig.5.22.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Paxillus* mediante ML. Grupo externo *P. rubicundulus*. A indica el subgrupo observado dentro del clado *P. involutus*, B indica el subgrupo observado dentro del clado *P. ammoniavirescens*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

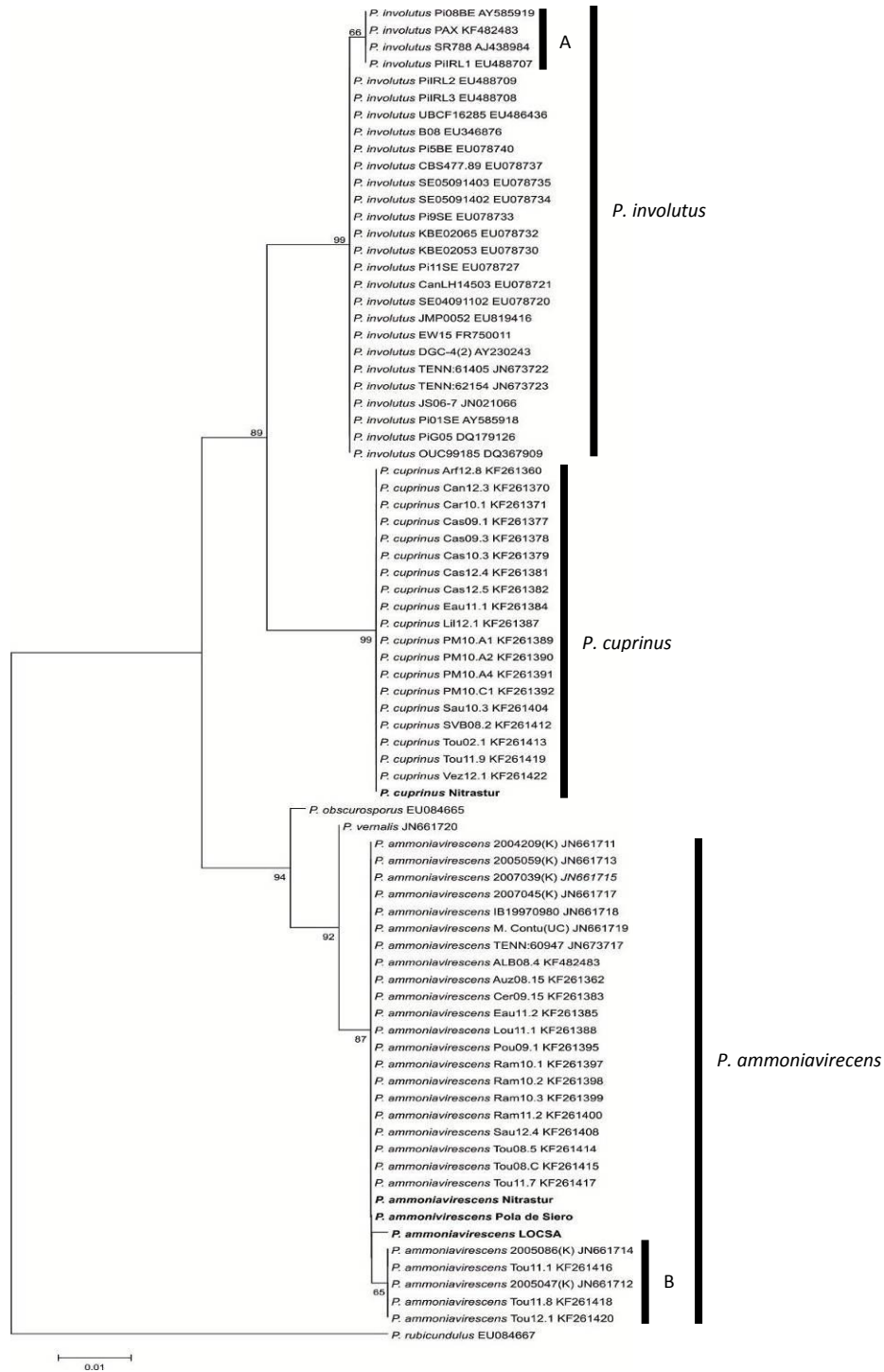


Fig.5.23.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Paxillus* mediante N-J. Grupo externo *P. rubicundulus*. **A** indica el subgrupo observado dentro del clado *P. involutus*, **B** indica el subgrupo observado dentro del clado *P. ammoniavirescens*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

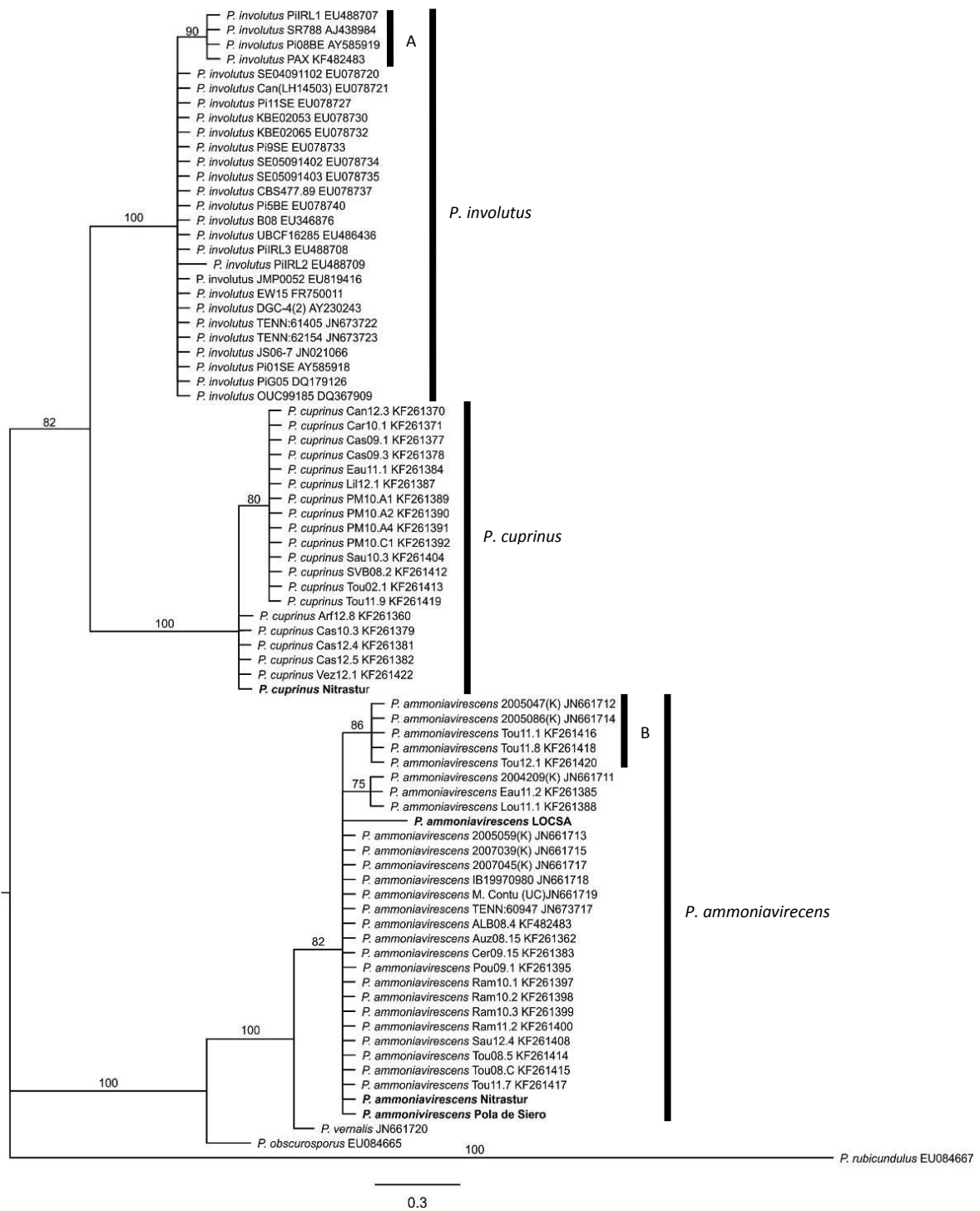


Fig.5.24.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Paxillus* mediante MB. Grupo externo *P. rubicundulus*. **A** indica el subgrupo observado dentro del clado *P. involutus*, **B** indica el subgrupo observado dentro del clado *P. ammoniavirescens*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.25. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *P. ammoniavirescens* (A) y *P. cuprinus* (B) tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I.

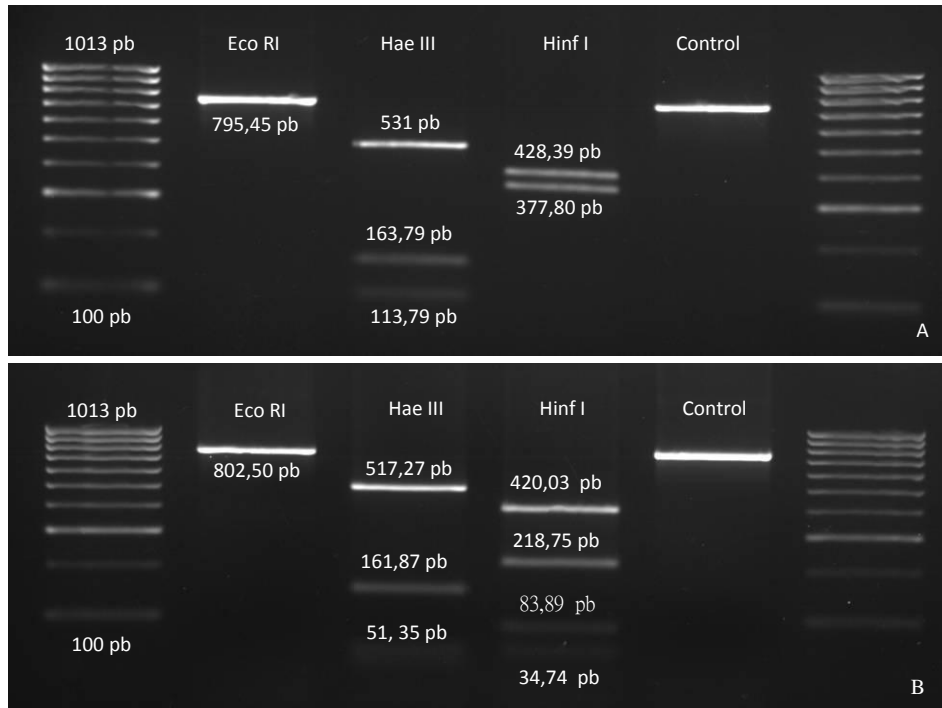


Fig.5.25.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para: **A:** *P. ammoniavirescens*, **B:** *P. cuprinus*, ambos procedentes de Nitrastur tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.7. *Scleroderma*

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.26.), de distancias (Fig.5.27.), y con el cálculo de la inferencia bayesiana (Fig.5.28.), ubican a las dos especies estudiadas como *S. citrinum* en las raíces de abedul y *S. bovista* en las raíces de chopo. Los árboles generados por las 3 metodologías generan una topología muy similar. Para el caso de *S. bovista* aparecen dos subclados soportados por elevados valores de bootstrap marcados por el origen geográfico; un subclado aglutina las muestras procedentes de EEUU, Japón, China y Nueva Zelanda y el otro aquellas procedentes de Europa (Serbia, Macedonia, Alemania y España) y donde se posiciona nuestra muestra. Para *S. citrinum* parece existir un subclado originado por las muestras procedentes de Escocia que difieren del resto.

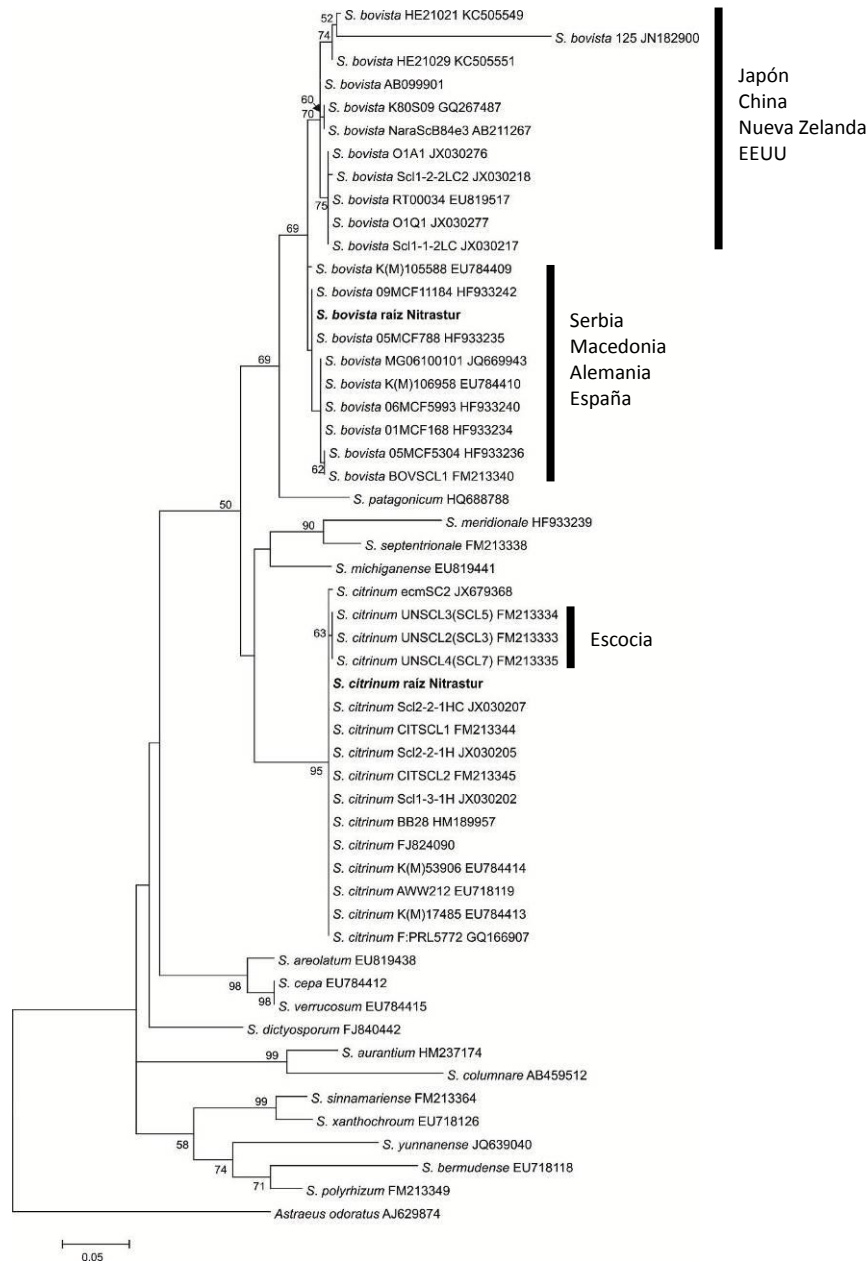


Fig.5.26.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Scleroderma* mediante ML. Grupo externo *Astraeus odoratus*. Solo se indican los valores de bootstrap superiores al 50%.



Fig.5.27.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Scleroderma* mediante N-J. Grupo externo *Astraeus odoratus*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

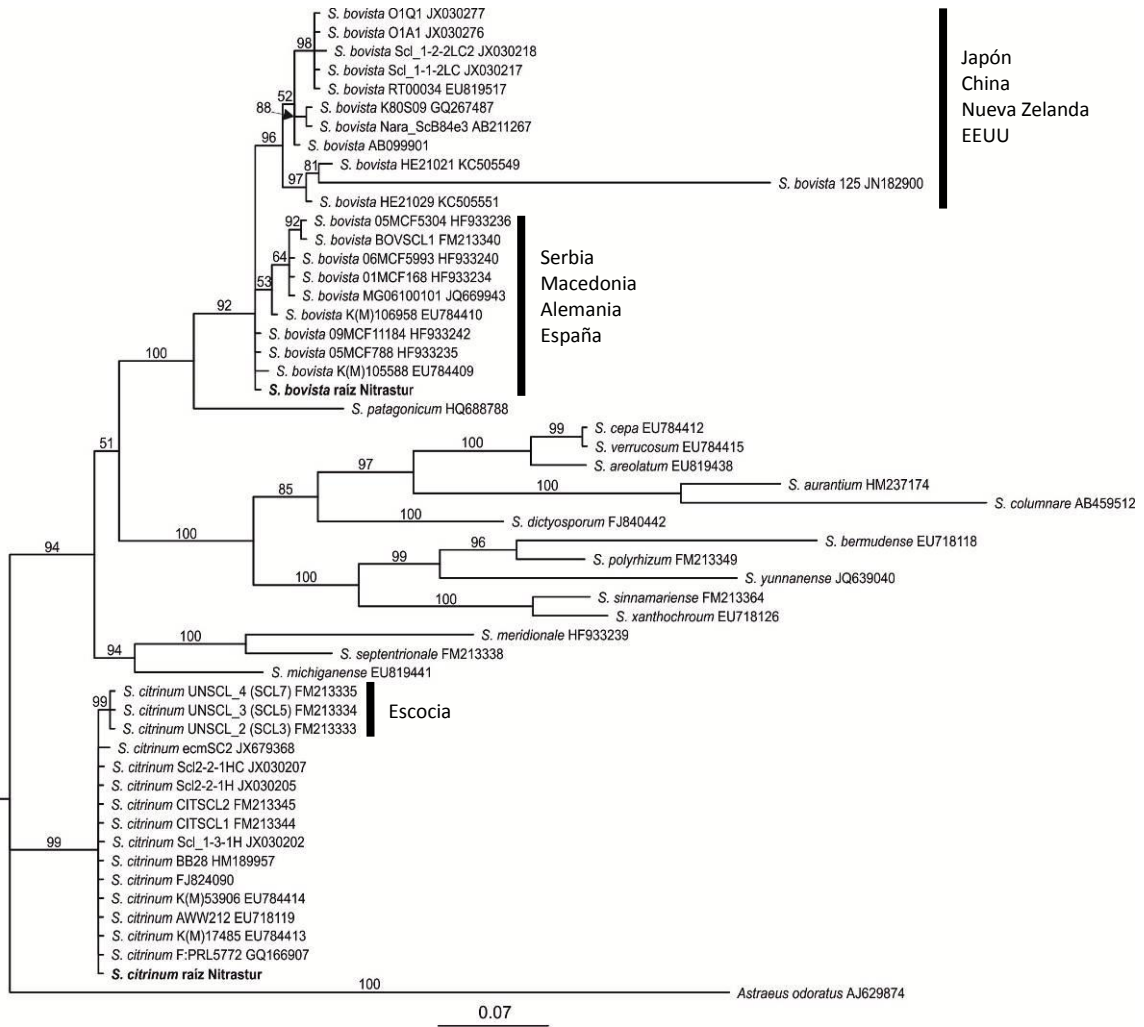


Fig.5.28.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Scleroderma* mediante MB. Grupo externo *Astraeus odoratus*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

5.3.8. *Tricholoma*

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.29.), de distancias (Fig.5.30.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.31.), ubican a las 2 especies del género estudiadas y de los emplazamientos Nitrastur y El Terronal como *T. cingulatum* y *T. fulvum*, agrupándolas con el resto de secuencias de sus respectivas especies.

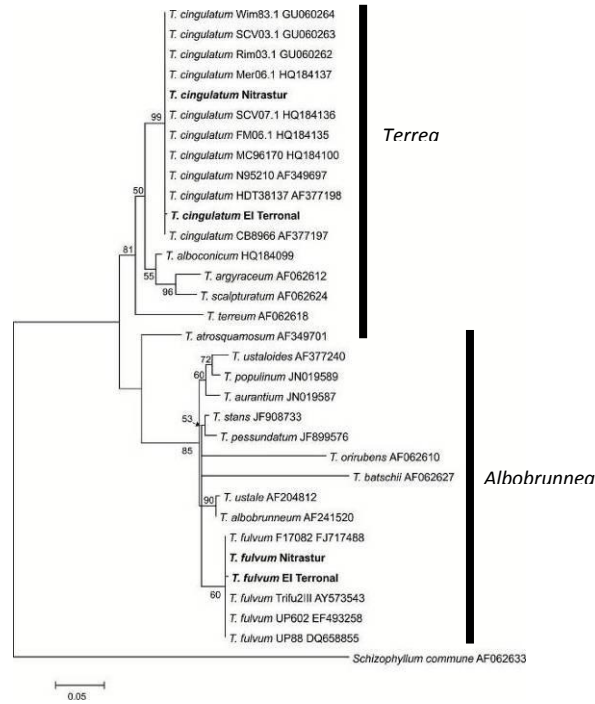


Fig.5.29.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Tricholoma* mediante ML. Grupo externo *Schizophyllum commune*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

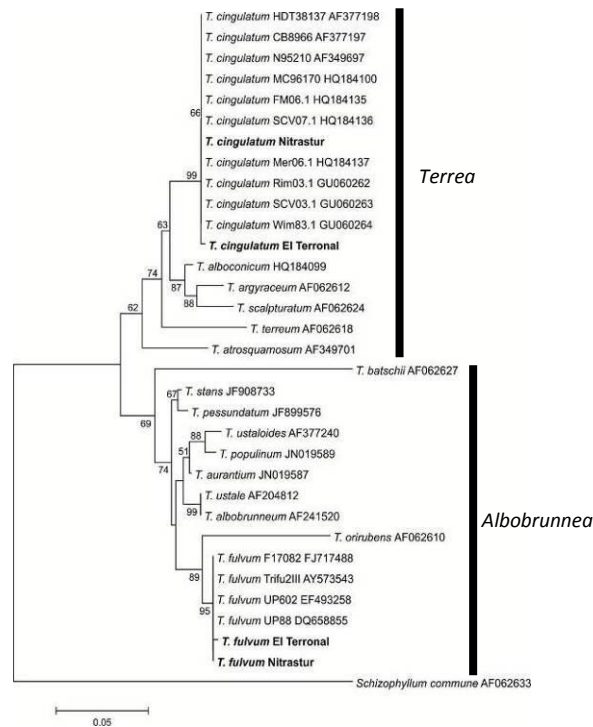


Fig.5.30.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Tricholoma* mediante N-J. Grupo externo *Schizophyllum commune*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

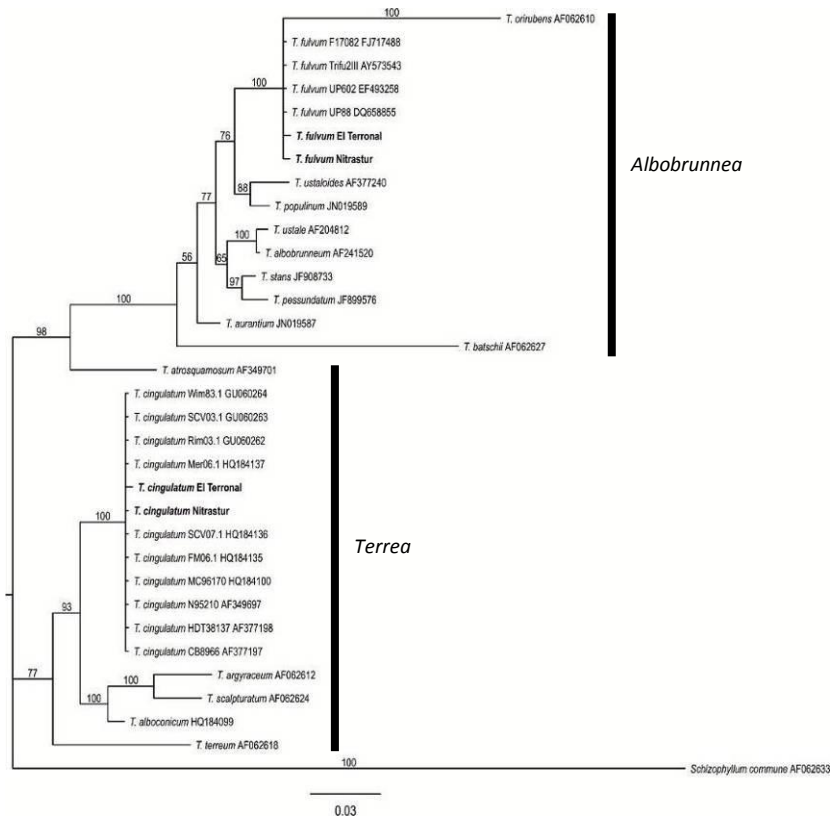


Fig.5.31.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Tricholoma* mediante MB. Grupo externo *Schizophyllum commune*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

La figura 5.32. muestra el patrón y el tamaño de las bandas obtenido para *T. cingulatum* (A) y *T. fulvum* (B) tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I.

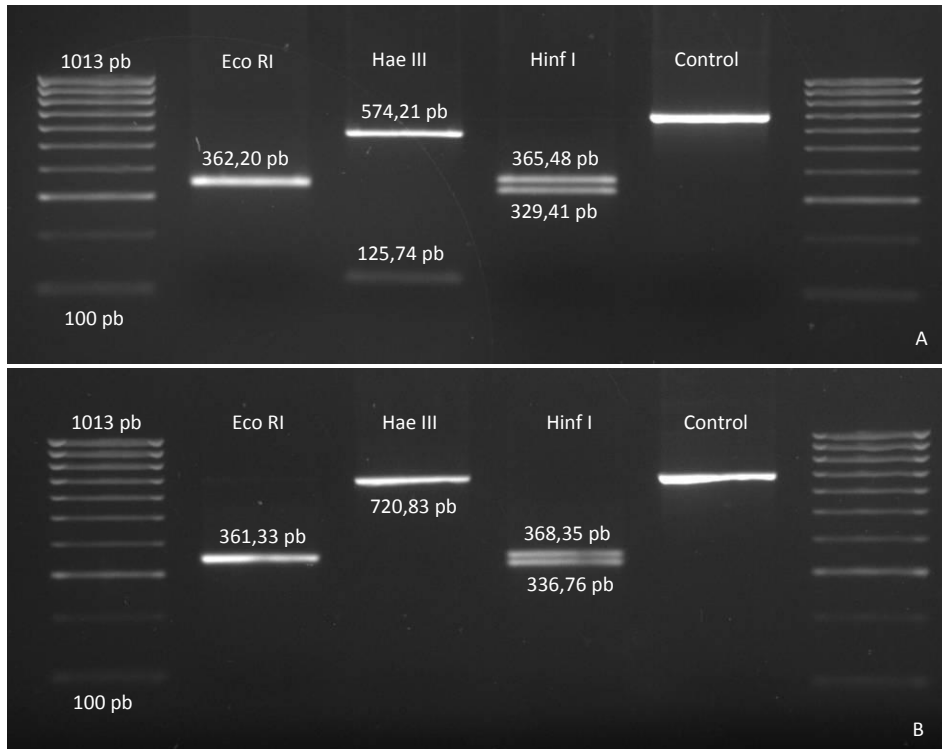


Fig.5.32.: Patrón de bandas ITS-RFLP obtenido para: **A** *T. cingulatum*, **B** *T. fulvum*, ambos procedentes de Nitrastur tras su digestión con los enzimas de restricción Eco RI, Hae III y Hinf I. El Control es la muestra sin digerir. pb indica pares de bases.

5.3.9. Helotiales

Con análisis de secuencias completas del ITS, mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.33.), de distancias (Fig.5.34.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.35.), se identificó, en las raíces de sauce, un *Meliniomyces* perteneciente al complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus*. En las raíces de abedul se detectó otro Helotial de difícil identificación ya que su ubicación y relación con otras especies varía dependiendo de la metodología utilizada

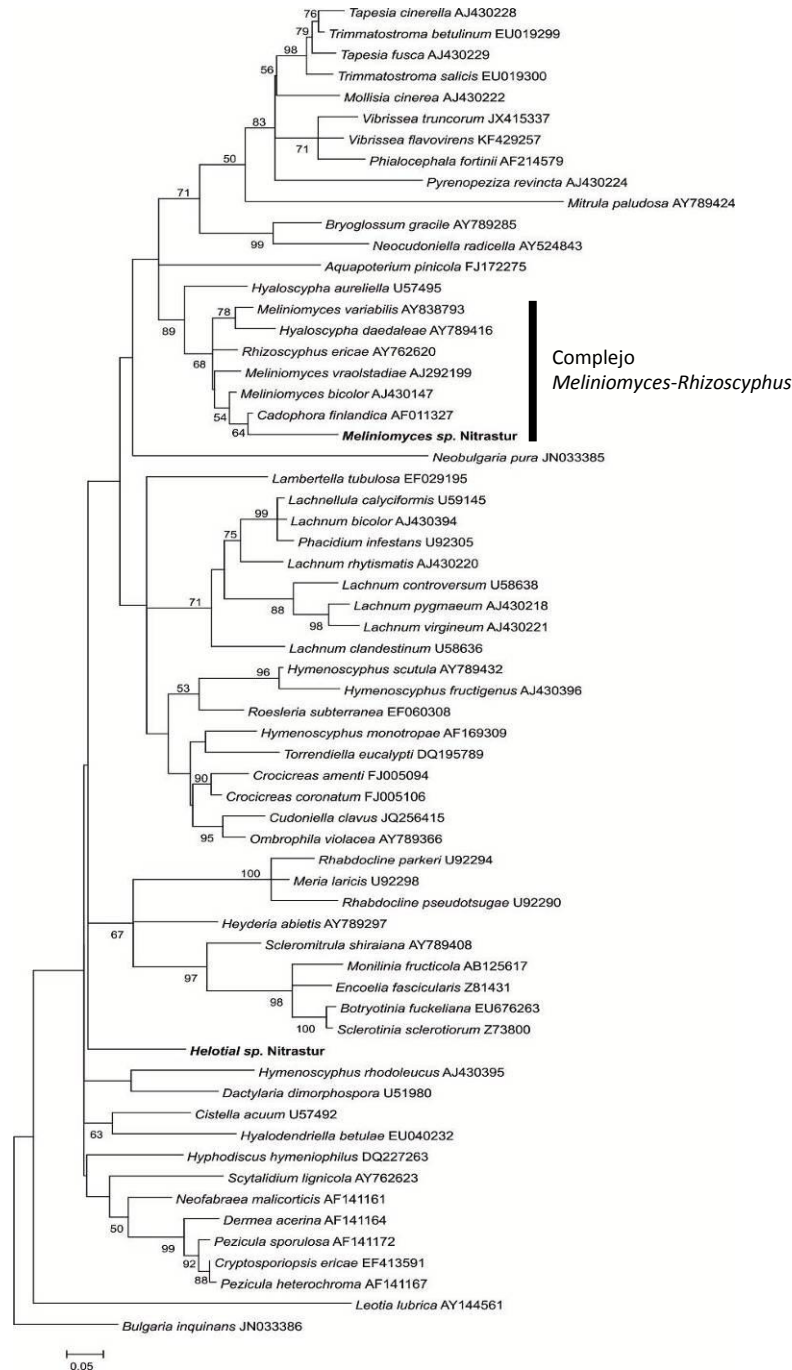


Fig.5.33.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Helotiales* mediante ML. Grupo externo *Bulgaria inquinans*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

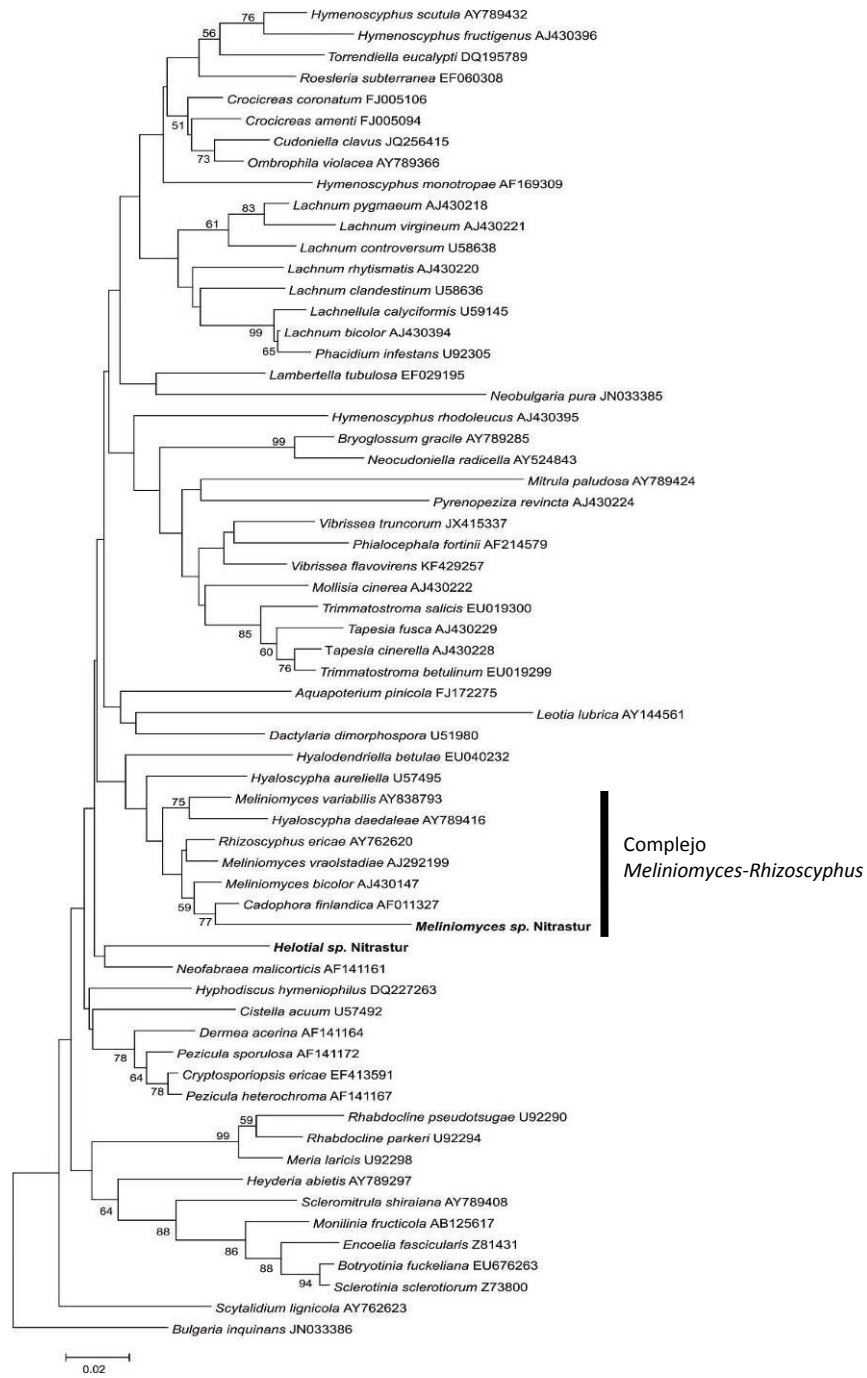


Fig.5.34.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Helotiales* N-J. Grupo externo *Bulgaria inquinans*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

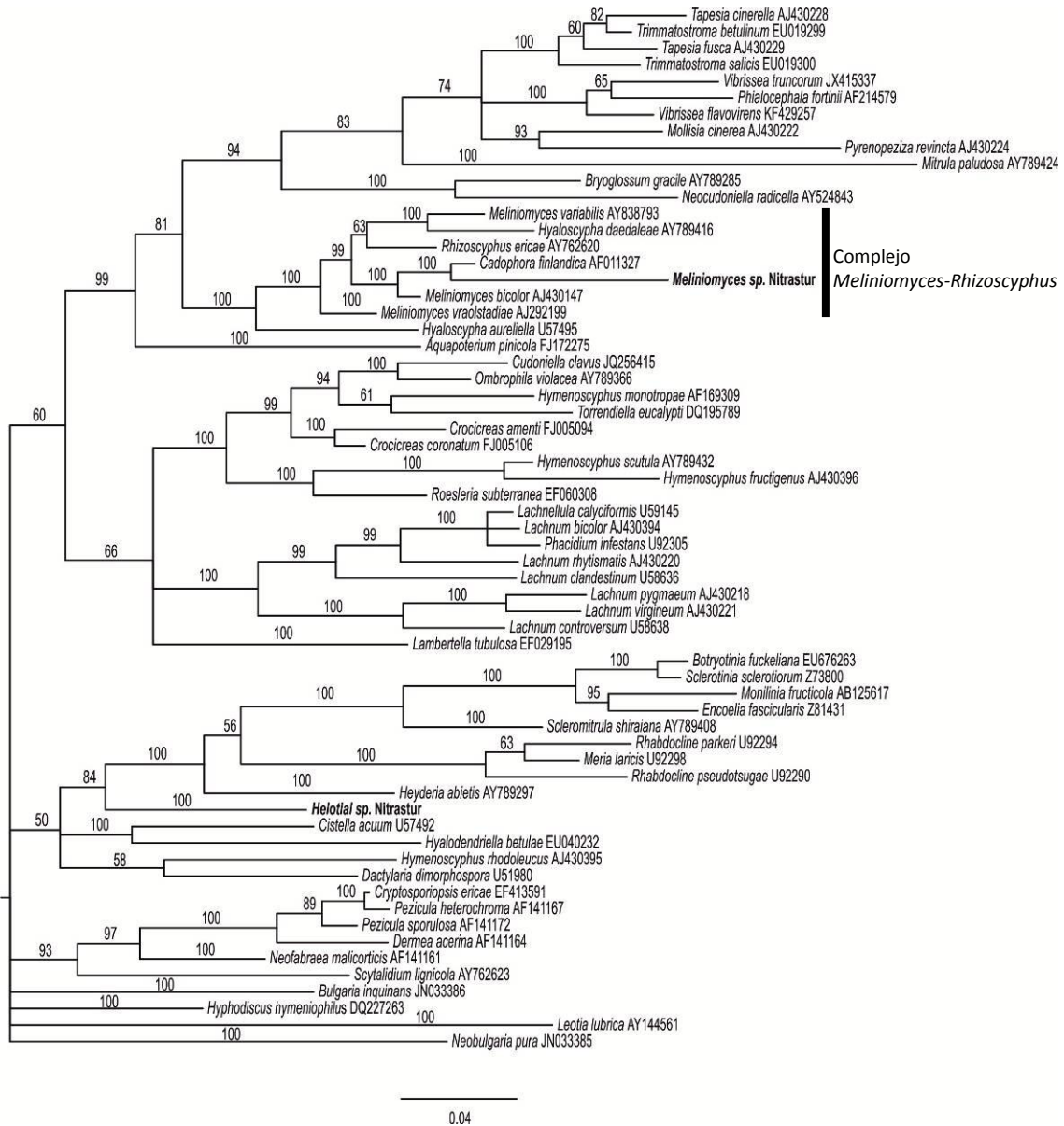


Fig. 5.35.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Helotiales* mediante MB. Grupo externo *Bulgaria inquinans*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

Con estos datos se intento ubicar la secuencia del *Helotial* encontrado, a partir de los 100 primeros resultados obtenidos en el BLAST. Aunque la mayoría de las secuencias con la que se encontraba similitud se encontraban sin identificar, todas las que si aparecían nomencluradas pertenecían a las familias *Hyaloscyphaceae* y *Heloticeae*. Por otro lado para intentar determinar la especie del *Meliniomyces* sp., se seleccionaron todas las secuencias disponibles de las especies que constituyen el complejo.

5.3.10. Familias Hyaloscyphaceae-Heloticeae

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias ITS, por mediante los métodos máxima probabilidad (Fig.5.36.), de distancias (Fig.5.37.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.38.), nos ubican la secuencia obtenida del Helotial próxima sino dentro de la clase *Hyaloscypha*, en un grupo sin identificar. Todas estas secuencias comparten el hecho de haber sido obtenidas del interior de raíces de diferentes huéspedes.

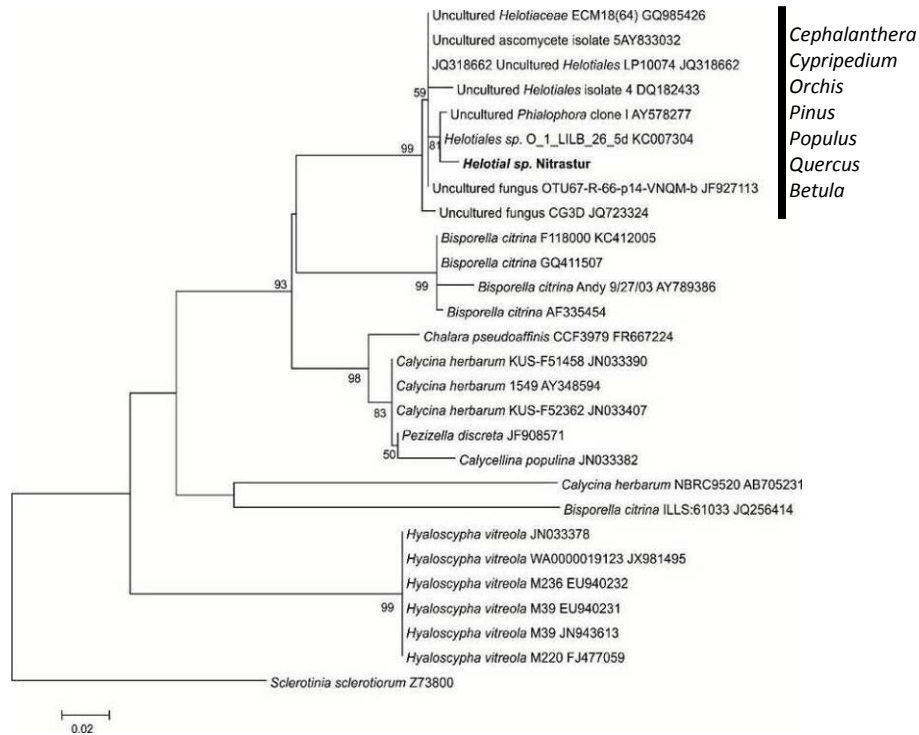


Fig.5.36.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hyaloscypha* mediante ML. Grupo externo *Sclerotinia sclerotiorum*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

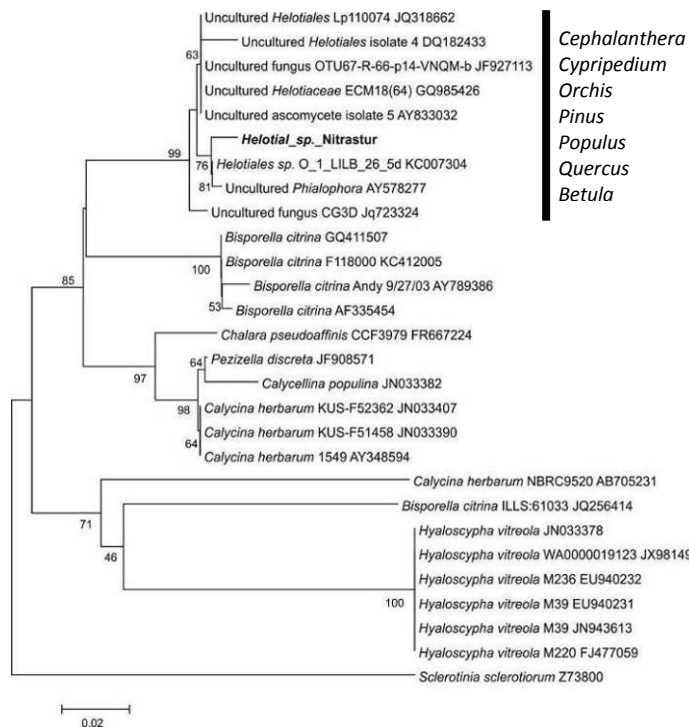


Fig.5.37.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hyaloscypha* mediante N-J. Grupo externo *Sclerotinia sclerotiorum*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

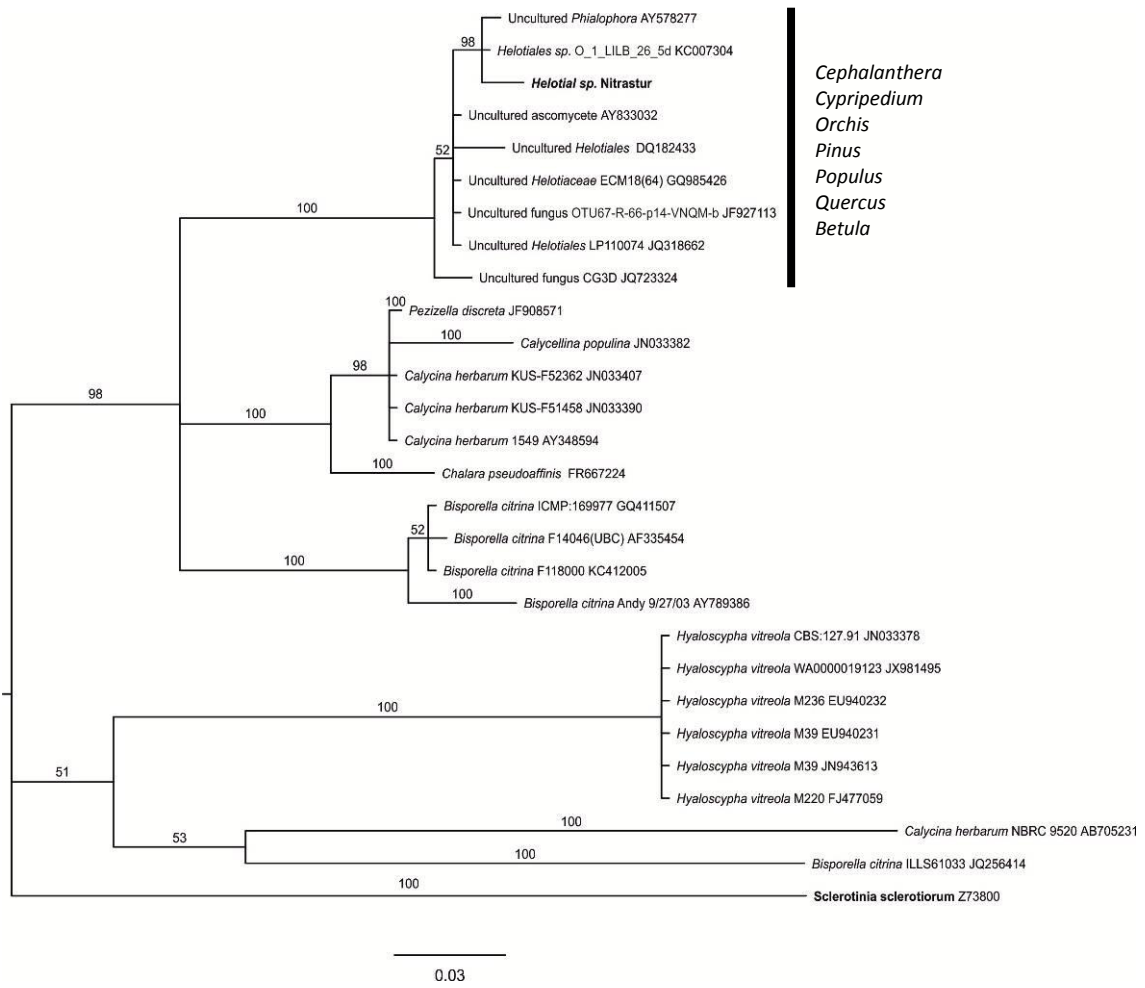


Fig.5.38.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Hyaloscypha* mediante MB. Grupo externo *Bulgaria inquinans*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

5.3.11. Complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus*

El análisis de las secuencias mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.5.39.), de distancias (Fig.5.40.) y de inferencia bayesiana (Fig.5.41.), nos ubican nuestra especie perteneciente al complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus* en dos posiciones diferentes. Mientras que mediante ML y MR nos la aglutinaría dentro de *Cadophora finlandica*, el N-J nos la define como *Meliniomyces bicolor*. Ambas especies supondría dos subclados dentro de un mismo clado, bien diferenciado del resto del resto de especies que constituyen este complejo.

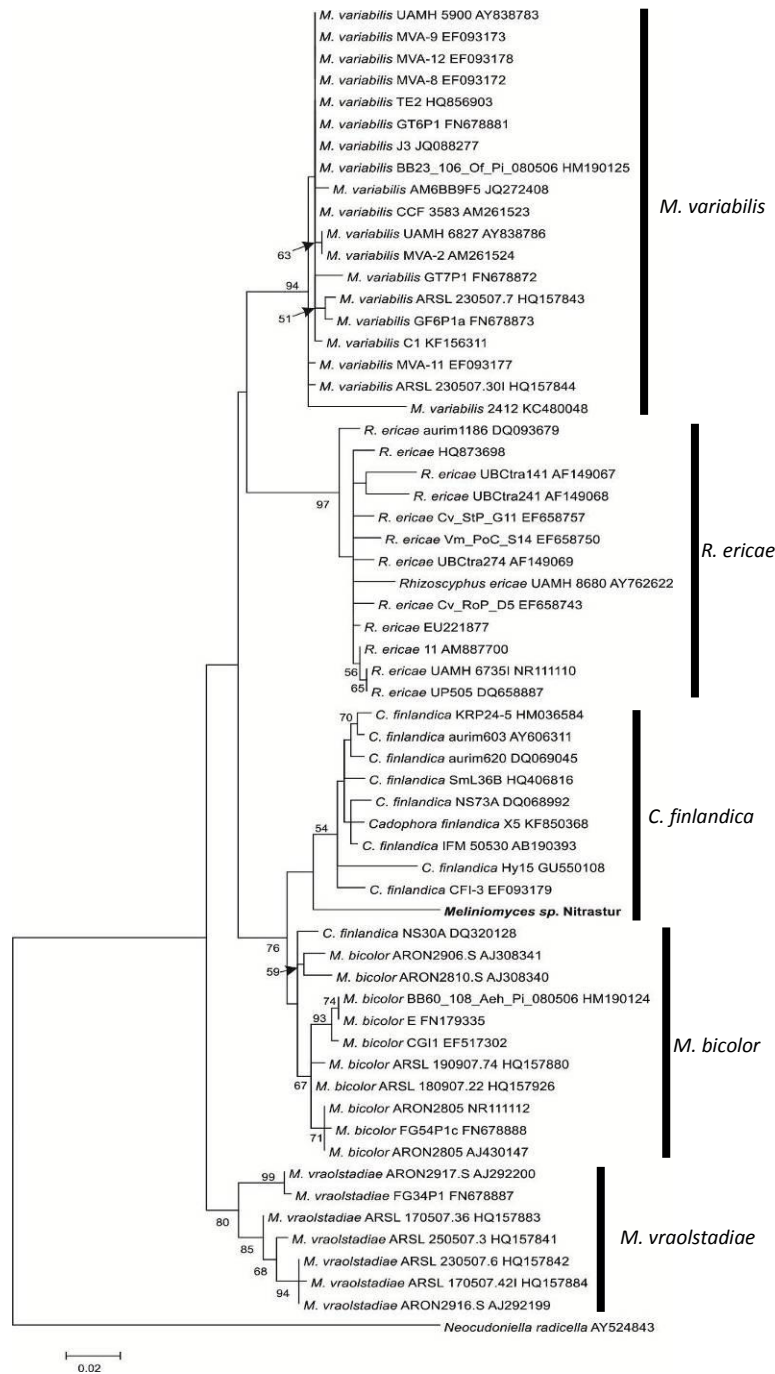


Fig.5.39.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus* mediante ML. Grupo externo *Neocudoniella radicella*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

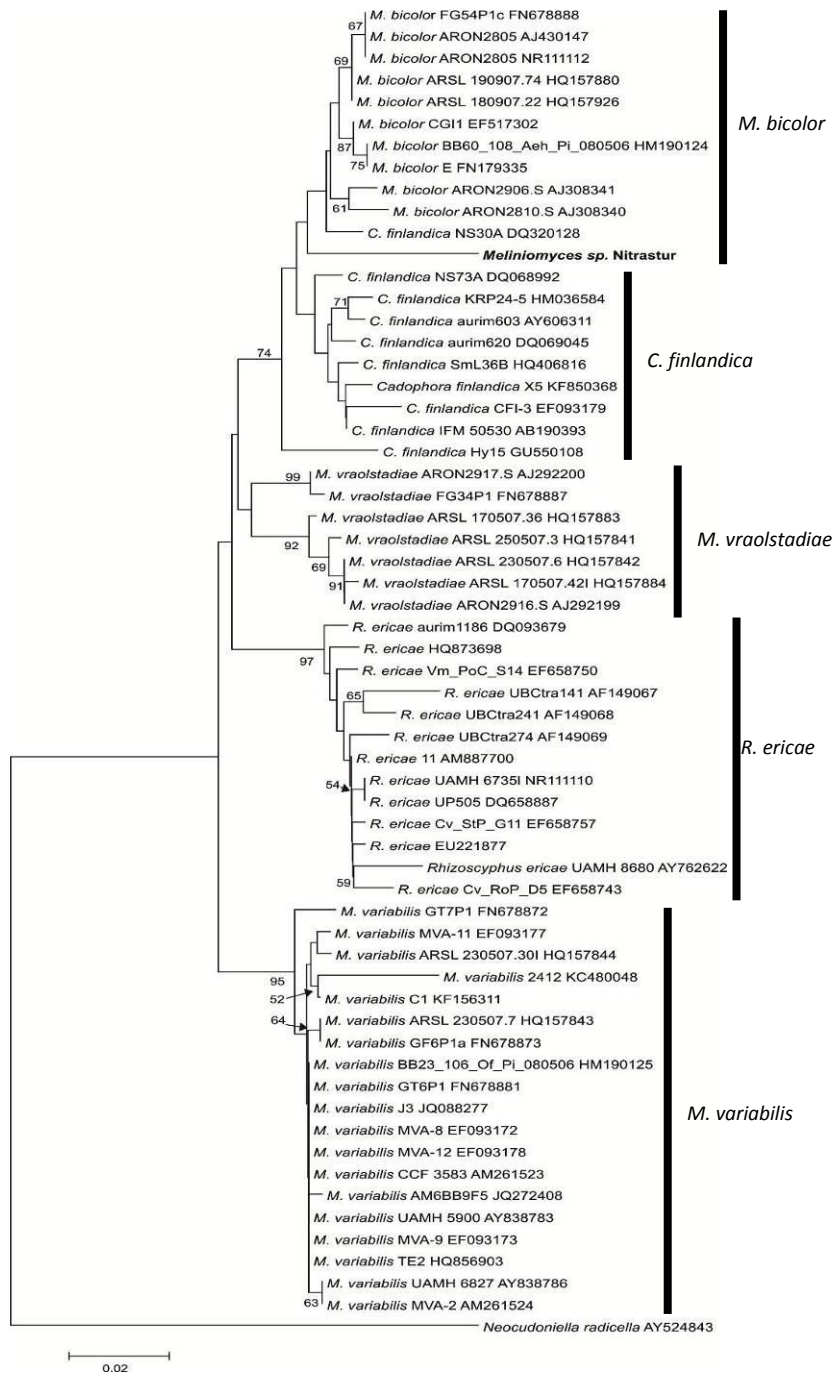


Fig.5.40.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras del complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus* mediante N-J. Grupo externo *Neocudoniella radiceella*. Solo se indican los valores de *bootstrap* superiores al 50%.

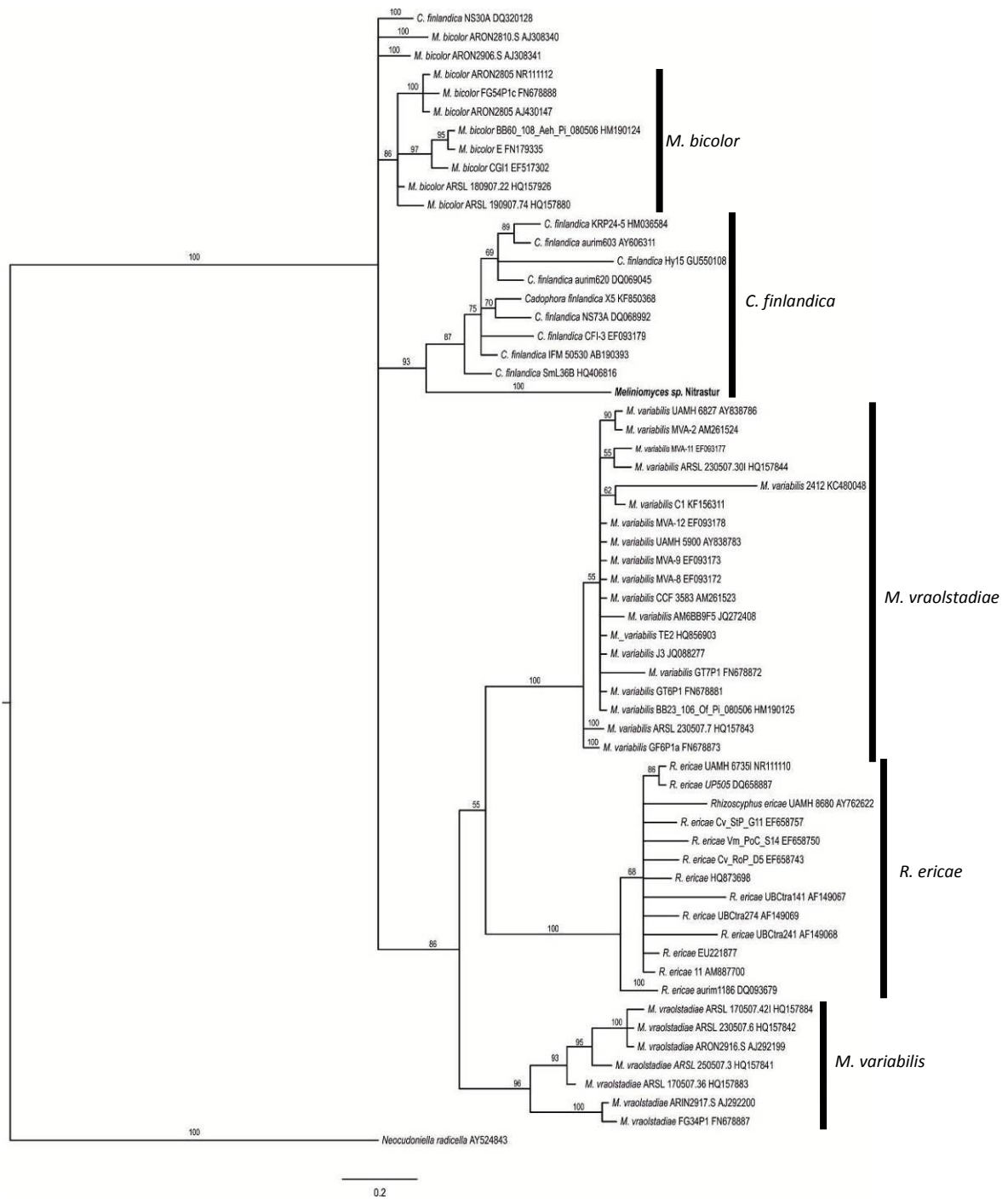


Fig.5.41.: Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus* mediante MB. Grupo externo *Neocudoniella radiceella*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

5.4. Discusión

La identificación taxonómica de los hongos como ya se ha dicho, se basa en la discriminación morfológica de diferentes caracteres, que en muchas ocasiones son efímeros y altamente variables debido a múltiples factores (clima, suelo, ecosistema, etc.). Como vía de complementación a la taxonomía clásica la identificación basada en herramientas moleculares está siendo ampliamente utilizada, especialmente en el caso del estudio de los hongos micorrícicos. De entre todas las posibles vías, el estudio de la región ITS del rADN es el que se ha utilizado más comúnmente, y de ahí que escogieramos su estudio para la correcta identificación de nuestras especies de interés.

Por una parte decidimos obtener las secuencias de la región ITS, para ser comparada con el resto de secuencias presentes en las bases de datos públicas, como GenBank (NCBI, Altschul *et al.*, 1997), y conseguir identificar la especie. Y por otra, realizar los patrones específicos de RFLP para cada especie, no para la identificación de la especie, sino para diferenciarlas entre ellas y poder disponer de un método rápido y económico de seguimiento de estas en su posterior aislamiento *in vitro*, crecimiento y utilización como inóculo.

En muchas ocasiones la identificación de la especie se realiza mediante un *BLAST*, con el objetivo de buscar la máxima semejanza de nuestra secuencia con otras que nos indiquen su afiliación taxonómica; sin embargo esto puede llevarnos a conclusiones erróneas. Diferentes autores como Ryberg *et al.* (2008) o Bidartondo *et al.* (2008) sugieren la importancia de una identificación precisa de estas secuencias subidas a las bases de datos, ya que en ocasiones contienen errores, como la incorrecta identificación de la especie o su no identificación obviando además en muchos casos su procedencia geográfica y posible hospedador. La incorrecta identificación puede llevar a numerosos problemas a la hora de repetir experimentos, optimizar condiciones de cultivo o enfrentarnos al diferente comportamiento que presentan distintas especies entre sí.

Es por ello que la realización de estudios filogenéticos, resulta fundamental tanto para identificar la especie o el clado donde se ubicaría nuestra muestra, como para entender las relaciones existentes entre diferentes especies y comprender mejor su diversidad y ecología.

Para el caso de la muestra de *Amanita muscaria* procedente de El Terronal, el estudio de las secuencias del subgénero *Amanita* sección *Amanita*, la ha ubicado dentro de lo que Oda *et al.* (2004) han denominado el grupo Euroasiático con elevados niveles de *bootstrap* (ML 98% y N-J 98%) y probabilidad posterior bayesina (MR 90%). Dentro de este clado estos autores asumen que la muestra procedente de Nueva Zelanda probablemente fue introducida desde Japón o algún área vecina. La mayoría de las secuencias utilizadas en este trabajo provienen de los estudios de Oda *et al.* (1999; 2002; 2004) y aunque no determinan con precisión los hospedadores bajo los que se recolectó cada muestra, indican que las muestras del subclado Euroasiático fueron recogidas en bosques de *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Betula*, *Fagus* y *Quercus* por debajo de la zona subalpina, señalando que las muestras de Japón se encuentran en bosques de *Pinaceae* y *Betula* siempre más próximas a esta última especie. En nuestro caso la muestra fue recogida bajo *B. celtiberica*, en un macroclima templado oceánico submediterráneo. Adicionalmente se ha conseguido un patrón diferencial y característico de RFLP para esta especie con los tres enzimas utilizados.

Para ubicar dentro del género nuestra muestra de *Hebeloma*, decidimos estudiar la filogenia de las especies con distribución Europea, debido al gran número de especies dentro del género y a la diferente organización taxonómica de secciones y subsecciones propuestas por diferentes autores como Boekhout (1982) y Vesterholt (1989). Aunque la topología de los tres árboles obtenidos es diferente, todos ubican claramente nuestra muestra dentro de la sección *Indusiata/Hebeloma* con elevados niveles de *bootstrap* (ML 85% y N-J 84%) y probabilidad posterior bayesina (MR 100%). Si vemos la distribución de las muestras de *H. mesophaeum*, la mayoría se agrupan en un subgrupo aunque con bajos valores de *bootstrap* (ML < 50% y N-J 59%) y más altos de probabilidad bayesiana (87%), quedando nuestra muestra fuera, al igual que otras muestras de la especie, procedentes de Japón, Alemania u Holanda. Destacar además la presencia dentro de este clado de especies como *H. sordidum*, *H. versipelle*, *H. malenconii*, *H. pallidum*, *H. psammophilum*, *H. collariatum* y *H. testaceum*, coincidiendo nuestros resultados con los de Boyle *et al.* (2006), quienes determinan que los límites entre estas especies parecen no estar claros y sugieren que varias de estas especies, como es el caso de *H. testaceum* puede ser sinónimos de *H. mesophaeum*. Por último cabe señalar que las dos muestras de esta especie procedentes de América del Norte, se agrupan dentro de la sección *Indusiata/Amygdalina*, estando relacionadas con especies con *H. remyi*, *H. atrobrunneum* y *H. nigellum*, por lo que podrían tratarse no de *H. mesophaeum* sino de otra especie. Con todos estos datos seguimos considerando nuestra muestra como *H. mesophaeum* aunque sería necesario un estudio en mayor profundidad de las poblaciones de esta especie. Al igual que en el caso de *A. muscaria* hemos conseguido un patrón diferencial y característico de RFLP para esta especie con los tres enzimas utilizados.

Con respecto al género *Inocybe*, el estudio del género *Inocybe* mediante la utilización de ITS a resultado muy complicado por diversos motivos. En primer lugar existe una gran cantidad de secuencias en el Genbank de este género sin identificar dejándonos una cantidad muy limitada de información fiable tal como observó Ryberg *et al.* (2008), y en segundo lugar tal como indica Matheny (2005) las filogenias obtenidas mediante el uso de nLSU y/o ITS son las menos robustas aportando una baja resolución, por lo que se propone la utilización de las regiones RPB1 y RPB2 para el estudio de este género. Para tratar de identificar las muestras de Nitrastur y El Terronal, se estudio el subgénero *Malloocybe*. Los arboles obtenidos presentan una topología muy similar, solo variando en la posición de *I. leucoblema*, y ubicando nuestras muestras junto con una de *I. dulcamara* procedente de Escandinavia. El resto de muestras de *I. dulcamara* aparecen dispersas a lo largo de los 3 árboles generando agrupamientos con elevados niveles de *bootstrap* y probabilidad posterior bayesiana, y que parecen estar relacionados con el tipo de hábitat y hospedador, aunque no podemos ratificarlo al desconocer en algunos casos su ubicación exacta o la vegetación asociada. Matheny (2005) determina que el clado *I. dulcamara* es monofiletico y contiene a *I. agardhii*, ubicándose esta especie dentro del mismo grupo que nuestras muestras, por lo que aunque no podemos confirmar que nuestras especie se trate de *I. dulcamara* tipo, si parece que se encontrarían dentro del grupo. Al igual que en los casos anteriores también se consiguió un patrón diferencial, repetitivo y característico de RFLP para estas muestras con los tres enzimas utilizados.

Para el estudio de las muestras del género *Lactarius* procedentes de Nitrastur y El Terronal, se analizaron las secuencias del subgénero *Piperites* con distribución Europea. Aunque mostrando una topología diferentes, los 3 árboles consenso generados nos ubican nuestras muestras junto con todas las secuencias de *L. pubescens*, por lo que podemos determinar claramente que se tratarían de esta especie. Sin embargo cabe destacar que el ML (85%) y el MB (100%) separan a *L. pubescens* como un grupo aislado próximo a *L. zonariodes*, mientras que el N-J lo agrupa junto con *L. auriolla*, *L. aquizonatus* o *L. illyricus*. Además en los árboles de ML y MR aparece dentro del grupo de *L. pubescens* un subgrupo de dos muestras

que denominamos A, procedentes de Alemania y Escocia, que en caso del N-J aparecen relacionados con *L. citriolens*. Para confirmar la presencia de este subgrupo sería necesario un estudio de las poblaciones a lo largo de Europa, tal como se hizo con *L. gerardii* (Stubbe *et al.*, 2010), y determinar si estas diferencias tienen una explicación filogeográfica. Como en casos anteriores también se consiguió un patrón diferencial, repetitivo y característico de RFLP para estas muestras con los tres enzimas utilizados.

La longitud de la región ITS del género *Leccinum* muestra gran heterogeneidad, oscilando entre 690 pb y 1480 pb, debido a las secuencias minisatélite CTATTGGAAAAG y CTAATAGAAAAG que aparecen repetidas en tándem y a los derivados mutacionales de las mismas, tal como observó den Bakker *et al.* (2004a). Este autor solo utilizó la región del ITS2 para la elaboración de los árboles filogenéticos de este género (den Bakker *et al.*, 2004b). En nuestro caso los resultados que obteníamos eran incongruentes, por lo que decidimos utilizar todas las secuencias disponibles del género que contuvieran todas las regiones del ITS, y, posteriormente, comparar las estructuras generadas en el ITS1 por estas repeticiones y su número. Al analizar las secuencias hemos encontrado 6 copias de CTATTGGAAAAG y 4 de CTAATAGAAAAG, mientras que den Bakker *et al.* (2004a) en *L. scabrum* encuentran 10 y 10. Si examinamos la morfología del ITS resultante del alineamiento de las secuencias (Fig.5.17.), se observa que la región ITS1 de nuestra muestra coincide con una muestra de *L. scabrum* y con otra de *L. rigidipes* ambas procedentes de Holanda, difiriendo de la otra muestra de *L. scabrum* incluida en este estudio procedente de Suecia, la cual presenta la misma morfología que las muestras de *L. rotundifoliae*. Los árboles consenso generados, de nuevo presentan una topología diferente. Aunque el ML y el MR agrupan las secuencias de la misma manera que se ha descrito anteriormente, coincidiendo con los resultados de den Bakker *et al.* (2004a), el N-J agrupa a todas estas especie juntas además de *L. palustre* y *L. variicolor* con valores de *bootstrap* bajos (<50%). den Bakker *et al.*, 2007, sugiere que *L. rotundifoliae* se trata de una especie hermana de *L. scabrum* exclusiva de ambientes árticos y asociada a *Betula* sp., y siendo los ejemplares oscuros fácilmente confundidos con *L. scabrum*. Adicionalmente *L. rigidipes* es prácticamente indistinguible de *L. scabrum* salvo por la presencia de elementos cilíndricos en la capa superficial de hifas del pileo (pileopellis), e incluso podrían tratarse de una misma especie. Con estos datos podemos concluir que nuestra especie se trata de *L. scabrum*. Al igual que con las otras especies se consiguió un patrón diferencial y característico de RFLP para estas muestras con los tres enzimas utilizados.

El género *Paxillus* es del que mayor número de muestras disponemos, siendo además especialmente común en zonas contaminadas o degradadas. Los árboles consenso generados mediante las tres metodologías presentan la misma topología separando, con elevados valores de *bootstrap* y probabilidad posterior bayesiana, las 6 especies estudiadas dentro del género y coincidiendo nuestros árboles con los de Jargeat *et al.* (2014). De esta manera hemos podido determinar que las muestras procedentes de la LOCSA, La Carrera (Siero) y de la zona 9 de muestreo (Capítulo 3) de Nitrastur se tratarían de *P. ammoniavirescens*, mientras que la muestra recogida en la zona 7 de Nitrastur se trataría de *P. cuprinus*. Esta es la primera vez que se tenga constancia que se haya encontrado esta última especie en España, ya que entorno a este género han existido numerosos errores a la hora de su identificación, atribuyendo prácticamente todos los ejemplares encontrados a *P. involutus*. No fue hasta los trabajos de Hedh *et al.* (2008), Vellinga *et al.* (2012) y Jargeat *et al.* (2014) cuando se comenzó a reconocer la presencia de diferentes especies en lo que algunos autores siguen denominando *P. involutus sensu lato*. Estas especies, en especial *P. ammoniavirescens* por su elevada variabilidad morfológica son extremadamente difíciles de diferenciar entre si y entre *P. involutus*, solo mostrando reacciones diferenciales de coloración en la superficie del pileo ante amonio concentrado. Adicionalmente, *P. cuprinus* parece mostrar una clara preferencia por *Betula* como hospedador mientras que *P. ammoniavirescens* muestra un amplio rango de

hospedadores. La presencia de ambas especies en un mismo emplazamiento confirma los datos aportados por Jargeat *et al.* (2014), de que las especies del género no son excluyentes. Otra característica de nuestros resultados es que a pesar de la baja variabilidad genética existente dentro de las especies, parece existir un subgrupo dentro de *P. ammoniavirescens* al que denominamos B, y otro dentro de *P. involutus* al que denominamos A, no siendo causada ni por presentar diferentes hospedadores ni por su distribución geográfica.

En cuanto a los patrones de bandas de RFLP obtenidos, esta técnica sirve para diferenciar *P. ammoniavirescens* de *P. cuprinus*. Aunque no hay digestión con Eco RI, si se produce con Hae III y con Hinf I. En ambas especies, Hae III produce un patrón de corte muy similar solo variando en el tamaño de la última banda observada (de 113,79 pb en *P. ammoniavirescens* y 31,35 pb en *P. cuprinus*). En Hinf I también se produce la digestión dando un patrón claramente diferencial, ya que mientras en *P. ammoniavirescens* solo se aprecian 2 bandas, en *P. cuprinus* se dan 4.

Como resultado del análisis de las secuencias del género *Scleroderma*, los 3 árboles consenso muestran una topología similar, ubicando la muestra procedente de las raíces de abedul claramente como *S. citrinum* y la de las raíces de chopo como *S. bovista*, ambas procedentes de Nitrastur. Al observar con detenimiento los árboles, parece que dentro de *S. citrinum* existe un subgrupo (ML 63%, N-J 65% y MB 99%) conformado por muestras procedentes de una misma ubicación en Escocia; para corroborar esta diferencia genética habría que estudiar más poblaciones de esta especie dentro de Escocia. Los datos obtenidos de *S. bovista* parecen separar la especie en 2 subclados con una distribución geográfica diferente como en el caso de *Amanita*. Por un lado se agrupan las muestras de EEUU, Japón, China y Nueva Zelanda, y por otro las de Serbia, Macedonia, Alemania y España.

Para el último género de Basidiomycetes estudiado, *Tricholoma*, se analizaron las secuencias pertenecientes a la Sección *Terrea*, Subsección *Terrea*, a la que pertenece *T. cingulatum*, y la Sección *Albobrunnea* a la que pertenece *T. fulvum*. Las muestras de ambas especies procedentes de Nitrastur y El Terronal, se agrupan con el resto de las secuencias de *T. cingulatum* y *T. fulvum*, confirmando claramente su identidad en ambos casos con elevados niveles de *bootstrap* y probabilidad posterior bayesiana. Para el caso de *T. cingulatum*, de acuerdo con Jageart *et al.* (2010), parece existir una clara especificidad por el huésped, el género *Salix*. En nuestras muestras este hecho parece confirmarse estando la muestra de Nitrastur recogida bajo ejemplares de *S. atrocinerea* y *S. caprea*, y en el caso de El Terronal bajo *S. caprea*. Para *T. fulvum* no podemos sacar esta misma conclusión, pero debido al escaso número de secuencias de esta especie disponibles y a la poca información que tenemos de ellas, solo sabiendo que dos de las secuencias se recogieron en bosque mixto. En nuestro caso, *T. fulvum* aparece bajo *B. celtiberica*, *S. atrocinerea* y *S. caprea* en ambos emplazamientos. Por último al igual que el caso del género *Paxillus* estas especies no son excluyentes ya que no solo aparecen en el mismo emplazamiento, sino en las mismas zonas de muestreo (Zona 6, 7, 9 y 11) en caso de Nitrastur sin entrar en competencia entre ellas. Con todo ello sería necesario un estudio en profundidad de esta especie para determinar este hecho.

En cuanto a los patrones de bandas de RFLP obtenidos, podemos determinar que esta técnica nos serviría para una discriminación entre ambas especies. Observamos que se produce la digestión con Eco RI en ambas especies, dando lugar a una sola banda de unas 360 pb que corta el ITS justo por la mitad. Con Hae III se produce un patrón diferencial, ya que en *T. cingulatum* se produce un corte dando lugar a dos bandas de 574,21 pb y 125,74 pb, mientras que en *T. fulvum* no se produce la digestión. Finalmente con Hinf I se produce la digestión dando en ambas especies una doble banda, la primera de unos 365 pb y la segunda de 330 pb.

El orden de Ascomycetes Helotiales, como ya se comentó en el Capítulo 4, incluye a un grupo ecológicamente muy diverso, en el que se ha demostrado la existencia de hongos formadores de ectomicorrizas (Vrålstad *et al.*, 2002a) y endófitos septados oscuros (DSE) (Mayerhofer *et al.*, 2013). Para tratar de ubicar dentro de este heterogéneo orden nuestras muestras, nos basamos en los trabajos de Tedersoo *et al.* (2009) y Vrålstad *et al.* (2002a y 2002b), que engloban el estudio de las principales especies de endófitos encontradas en raíces de diferentes hospedadores. Los árboles consenso generados muestran una topología diferente. El *Meliniomyces* sp. encontrado en las raíces de sauce, pertenece a lo que Tedersoo *et al.* (2009) denominan el complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus*. El otro Helotial encontrado dentro las raíces de abedul aparece en 3 posiciones diferentes de dependiendo de la metodología utilizada; por lo que no pudimos determinar a qué grupo o especie pertenece.

Para intentar determinar el Helotial desconocido, se hizo un nuevo análisis examinando los 100 primeros resultados del BLAST realizado con su secuencia. En primer lugar, nos encontramos que la inmensa mayoría de las secuencias se encontraban sin identificar, figurando como Helotial sp. o Ascomycete sp. Para elaborar nuestros árboles, seleccionamos aquellas secuencias que, aún sin estar identificadas, presentaban un *Blast score* = 0.0 y un *Query coverage* = 99 %. Dentro del resto de resultados encontramos a secuencias de las especies *Bisporella citrina*, perteneciente familia Heloticeae, y *Chalara pseudoaffinis*, *Calycina herbarum*, *Pezizella discreta* y *Calycellina populina*, todas ellas pertenecientes a la familia *Hyaloscyphaeaceae*. Se incluyeron todas las secuencias disponibles de estas especies así como las secuencias de *Hyaloscypha vitreola* especie tipo de la familia *Hyaloscyphaeaceae*. Los árboles resultantes del análisis de todas estas secuencias, ubican a nuestra muestra con elevados niveles de *bootstrap* (ML 99%, N-J 99%) y probabilidad posterior bayesiana (MB 100%) junto todas aquellas que estaban sin identificar, y que poseen la característica de haber sido aisladas de las raíces de diferentes hospedadores. Su relación con las otras especies varía dependiendo de la metodología utilizada, mientras que el ML y N-J la aproxima a *Bisporella citrina*, el MB a otras especies de la familia *Hyaloscyphaeaceae*. La posición de numerosas especies dentro del orden Helotiales es muy compleja, existiendo especies con una posición incierta tal como se ve en la última reorganización de la familia *Hyaloscyphaeaceae* (Han *et al.*, 2014), en donde además aparecen intercaladas dentro de esta familia especies pertenecientes a *Vibrisseaceae* o *Dermateaceae*. Lo que parece claro es que existe una especie o especies no identificadas dentro del orden Helotiales y entre los límites de las familias *Hyaloscyphaeaceae* y *Heloticeae* que aparece como endófito y generando micorrizas en algunos casos en las raíces de diferentes hospedadores. Sin embargo aún con la secuencia obtenida y sus características microscópicas en las raíces de sauce, no podemos confirmar que se trate de una nueva especie. Para ello sería necesario la obtención de más muestras y su aislamiento *in vitro*.

Finalmente, basándonos en los trabajos de Hambleton y Singler (2005) y Vrålstad *et al.* (2002a) seleccionamos todas las secuencias de las especies que conformar el complejo *Meliniomyces-Rhizoscyphus*, para tratar de identificar la especie encontrada en sauce. Los árboles resultantes muestran una topología diferentes, mientras que el ML (<50%) y MB (93%) nos ubicarían nuestra muestra como *Cadophora finlandica*, el N-J (<50%) la incluye dentro de *M. bicolor*. Ambas especies son consideradas por Grelet *et al.* (2010) como un solo clado en la que cada especie constituiría un subclado relacionadas entre ellas. Si comparamos el morfotipo generado por este hongo y los generados por Vrålstad *et al.* (2002b) con *M. bicolor*, se aprecian diferencias con respecto a nuestras muestras. Estos autores observan unas ectomicorrizas formadas por *M. bicolor* tanto en *Betula pubescens* como en *Picea abies* de coloración cambiante de blancas a negras, muy parecidas a las producidas por *Cenococcum geophilum*. Por otro lado Wilcox y Wang (1987) y Ursic y Peterson (1997) determinan que los morfotipos generados por *C. finlandica* van gradualmente del ambar al marrón y de

bicoloreado a negro, siendo más parecidas estas descripciones al morfotipo 4 encontrado en sauce. Con todo ello creemos que muy probablemente se trate de la especie *C. finlandica*.

Los resultados obtenidos en conjunto reflejan la necesidad de una adecuada identificación de los aislamientos con los que posteriormente se pretende trabajar, así como para comprender de gran diversidad y complejidad de las asociaciones fúngicas presentes en ambientes extremos, como es el caso de los suelos altamente contaminados. Si bien para algunos géneros la identificación macroscópica correspondía con los datos obtenidos al elaborar los árboles filogenéticos, hemos sido capaces de ver su variación genética relacionada con la distribución geográfica, el hospedador o muy probablemente el tipo de ecosistema. En otros casos ha resultado imprescindible para determinar el organismo con el que estábamos trabajando como ha ocurrido para el caso de los Ascomycetes.

5.5. Bibliografía

- Aanen, D.K., Kuyper, T.W., Boekhout, T., Hoekstra, R.F. (2000). Phylogenetic relationships in the genus *Hebeloma* based on ITS1 and 2 sequences, with special emphasis on the *Hebeloma crustuliniforme* complex. *Mycologia*. 92:269-281.
- Abeln, E.C., de Pagter, M.A., Verkley, G.J. (2000). Phylogeny of *Pezizula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia*. 92:685-693.
- Addy, H.D., Hambleton, S., Currah, R.S. (2000). Distribution and molecular characterization of the root endophyte *Phialocephala fortinii* along an environmental gradient in the boreal forest of Alberta. *Mycol Res*. 104:1213-1221.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on*. 19:716-723.
- Allen, T.R., Millar, T., Berch, S.M., Berbee, M.L. (2003). Culturing and direct DNA extraction find fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytol*. 160:255-272.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25:3389.
- Baird, R., Wood-Jones, A., Varco, J., Watson, C., Starrett, W., Taylor, G., Johnson, K. (2014). *Rhododendron* decline in the Great Smoky Mountains and surrounding areas: intensive site study of biotic and abiotic parameters associated with the decline. *Southw Naturalist*. 13:1-25.
- Baral, H.O., De Sloover, J.R., Huhtinen, S., Laukka, T., Stenroos, S. (2009). An emendation of the genus *Hyaloscypha* to include *Fuscoscypha* (*Hyaloscyphaceae*, *Helotiales*, *Ascomycotina*). *Karstenia*. 49:1-17.
- Baral, H.O., Galán, R., Platas, G., Tena, R. (2013). *Phaeohelotium undulatum* comb. nov. and *Phaeoh. succineoguttulatum* sp. nov., two segregates of the *Discinella terrestris* aggregate found under *Eucalyptus* in Spain: taxonomy, molecular biology, ecology and distribution. *Mycosystema*. 32:386-428.
- Bauman, J.M. (2010). Ectomycorrhizal Communities Associated with Restoration Plantings of American Chestnut (*Castanea Dentata*) Seedlings on Ohio Mine Lands: Planting Methodologies to Promote Root Colonization. Doctoral dissertation, Miami University.
- Belfiori, B., Riccioni, C., Tempesta, S., Pasqualetti, M., Paolocci, F., Rubini, A. (2012). Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiol Ecol*. 81:547-561.
- Bidartondo, M.I., y Bruns, T.D. (2001). Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (*Ericaceae*): widespread phylogenetic and geographical structure. *Mol Ecol*. 10:2285-2295.

- Bidartondo, M.I. y Bruns, T.D. (2002). Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (*Ericaceae*): specificity for fungal species groups. *Mol Ecol.* 11:557-569.
- Bidartondo, M.I. *et al.* (2008). Preserving accuracy in GenBank. *Science* 319: 1616a. <http://dx.doi.org/10.1126/science.319.5870.1616a>.
- Bills, G.F., Platas, G., Peláez, F., Masarekar, P. (1999). Reclassification of a pneumocandin-producing anamorph, *Glarea lozoyensis* gen. et sp. nov., previously identified as *Zalerion arboricola*. *Mycol Res.* 103:179-192.
- Boekhout, T. (1982). De secties *Denudata* en *Anthracophila* Boekhout nom. Prov. Van het geslacht *Hebeloma* (Fr.) Kumm. In Nederland en aangrenzende gebieden. Internal report. Leiden:Rijksherbarium.pp 146.
- Boyle, H., Zimdars, B., Renker, C., Buscot, F. (2006). A molecular phylogeny of *Hebeloma* species from Europe. *Mycol Res.* 110:369-380.
- Brock, P.M., Döring, H., Bidartondo, M.I. (2009). How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytol.* 181:719-724.
- Buyck, B., Hofstetter, V., Eberhardt, U., Verbeken, A., Kauff, F. (2008). Walking the thin line between *Russula* and *Lactarius*: the dilemma of *Russula* subsect. *Ochricomptae*. *Fungal Divers.* 28:15-40.
- Cantrell, S.A. y Hanlin, R.T. (1997). Phylogenetic relationships in the family *Hyaloscyphaceae* inferred from sequences of ITS regions, 5.8 S ribosomal DNA and morphological characters. *Mycologia.* 89:745-755.
- Crous, P.W., Braun, U., Schubert, K., Groenewald, J.Z. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Stud Mycol.* 58:33-56.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 9:772-772.
- den Bakker, H.C., Gravendeel, B., Kuyper, T.W. (2004a). An ITS phylogeny of *Leccinum* and an analysis of the evolution of minisatellite-like sequences within ITS1. *Mycologia.* 96:102-118.
- den Bakker, H.C., Zuccarello, G.C., Kuyper, T.H., Noordeloos, M.E. (2004b). Evolution and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Leccinum*. *New Phytol.* 163:201-215.
- den Bakker, H.C., Zuccarello, G.C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E. (2007). Phylogeographic patterns in *Leccinum* sect. *Scabra* and the status of the arctic-alpine species *L. rotundifoliae*. *Mycol Res.* 111:663-672.
- Dentinger, B.T., Didukh, M.Y., Moncalvo, J.M. (2011). Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS One.* 6:e25081.
- Durall, D.M., Gamiet, S., Simard, S.W., Kudrna, L., Sakakibara, S.M. (2006). Effects of clearcut logging and tree species composition on the diversity and community composition of epigeous fruit bodies formed by ectomycorrhizal fungi. *Botany.* 84:966-980.

- Eberhardt, U., Oberwinkler, F., Verbeken, A., Rinaldi, A.C., Pacioni, G., Comandini, O. (2000). *Lactarius ectomycorrhizae* on *Abies alba*: morphological description, molecular characterization, and taxonomic remarks. *Mycologia*. 92:860-873.
- Eberhardt, U. y Verbeken, A. (2004). Sequestrate *Lactarius* species from tropical Africa: *L. angiocarpus* sp. nov. and *L. dolichoaulis* comb. nov. *Mycol Res*. 108:1042-1052.
- Eberhardt, U., Beker, H.J., Vila, J., Vesterholt, J., Llimona, X., Gadjieva, R. (2009). *Hebeloma* species associated with *Cistus*. *Mycol Res*. 113:153-162.
- Eberhardt, U., Beker, H.J., Vesterholt, J., Dukik, K., Walther, G., Vila, J., Brime, S.F. (2013). European species of *Hebeloma* section *Theobromina*. *Fungal Divers*. 58:103-126.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 32:1792-1797.
- Fukami, T., Dickie, I.A., Paula Wilkie, J., Paulus, B.C., Park, D., Roberts, A., Buchanan P.K., Allen, R.B. (2010). Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecol Lett*. 13:675-684.
- Geml, J., Timling, I., Robinson, C.H., Lennon, N., Nusbaum, H.C., Brochmann, C., Noordeloos M.E., Taylor, D.L. (2012). An arctic community of symbiotic fungi assembled by long-distance dispersers: phylogenetic diversity of ectomycorrhizal basidiomycetes in Svalbard based on soil and sporocarp DNA. *J Biogeography*. 39:74-88.
- Gernandt, D.S., Camacho, F.J., Stone, J.K. (1997). *Meria laricis*, an anamorph of *Rhabdocline*. *Mycologia*. 89:735-744.
- Gorzalak, M.A., Hambleton, S., Massicotte, H.B. (2012). Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal Ecol*. 5:36-45.
- Grelet, G.A., Johnson, D., Paterson, E., Anderson, I.C., Alexander, I.J. (2009). Reciprocal carbon and nitrogen transfer between an ericaceous dwarf shrub and fungi isolated from *Piceirhiza bicolorata* ectomycorrhizas. *New Phytol*. 182:359-366.
- Grelet, G.A., Johnson, D., Vrålstad, T., Alexander, I.J., Anderson, I.C. (2010). New insights into the mycorrhizal *Rhizoscyphus ericae* aggregate: spatial structure and co-colonization of ectomycorrhizal and ericoid roots. *New Phytol*. 188:210-222.
- Grubisha, L.C., Trappe, J.M., Molina, R., Spatafora, J.W. (2002). Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences. *Mycologia*. 94:607-619.
- Grubisha, L.C., Levens, N., Olson, M.S., Lee Taylor, D. (2012). Intercontinental divergence in the *Populus*-associated ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma populinum*. *New Phytol*. 194:548-560.
- Gube, M. y Dörfelt, H. (2011). Gasteromycetation in Agaricaceae s.l. (Basidiomycota): Morphological and ecological implementations. *Feddes Repert*. 122:367-390.

- Hambleton, S. y Sigler, L. (2005). *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* *Hymenoscyphus ericae* *Leotiomyces*. *Stud Mycol.* 53:1-27.
- Han, J.G., Hosoya, T., Sung, G.H., Shin, H.D. (2014). Phylogenetic reassessment of *Hyaloscyphaceae* sensu lato (*Helotiales*, *Leotiomyces*) based on multigene analyses. *Fungal Biol.* 118:150-167.
- Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y., Sano, T. (2004). *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 70:297-307.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T.A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 22:160-174.
- Hedh, J., Samson, P., Erland, S., Tunlid A. (2008). Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycol Res.* 112:965-975.
- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M.J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:12002–12006.
- Holst-Jensen, A., Kohn, L., Jakobsen, K., Schumacher, T. (1997). Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*) based on coding and noncoding rDNA sequences. *Am J Bot.* 84:686-686.
- Hoist-Jensen, A., Vaage, M., Schumacher, T. (1998). An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic J Bot.* 18:705-719.
- Hryniewicz, K., Toljander, Y.K., Baum, C., Fransson, P.M., Taylor, A.F., Weih, M. (2012). Correspondence of ectomycorrhizal diversity and colonisation of willows (*Salix spp.*) grown in short rotation coppice on arable sites and adjacent natural stands. *Mycorrhiza.* 22:603-613.
- Hustad, V.P., Miller, A.N., Moingeon, J.M., Priou, J.P. (2011). Inclusion of *Nothomitra* in *Geoglossomyces*. *Mycosphere.* 2:646-654.
- Jargeat, P., Martos, F., Carriconde, F., Gryta, H., Moreau, P.A., Gardes, M. (2010). Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma scalpturatum* complex (Basidiomycota). *Mol Ecol.* 19:5216-5230.
- Jargeat, P., Chaumeton, P-M., Navaud, O., Vizzini, A., Gryta, H. (2014). The *Paxillus involutus* (*Boletales*, *Paxillaceae*) complex in Europe: Genetic diversity and morphological description of the new species *Paxillus cuprinus*, typification of *P. involutus* s.s., and synthesis of species boundaries. *Fungal Biol.* 118:12-31.
- Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G., Berveiller, D., Damesin, C., Selosse, M.A. (2005). Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol.* 166:639-653.

- Kanchanaprayudh, J., Hogetsu, T., Zhou, Z., Yomyart, S., Sihanonth, P. (2003). Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. *Mycoscience*. 44:287-294.
- Kernaghan, G. y Patriquin, G. (2011). Host associations between fungal root endophytes and boreal trees. *Microb Ecol*. 62:460-473.
- Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Ohta, A., Suzuki, K. (2000). Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. *Mycol Res*. 104:1427-1430.
- Kirchmair, M., Neuhauser, S., Buzina, W., Huber, L. (2008). The taxonomic position of *Roesleria subterranea*. *Mycol Res*. 112:1210-1219.
- Koukol, O. (2011). New species of *Chalara* occupying coniferous needles. *Fungal Divers*. 49:75-91.
- Kranabetter, J.M., Friesen, J., Gamiet, S., Kroeger, P. (2009). Epigeous fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi as indicators of soil fertility and associated nitrogen status of boreal forests. *Mycorrhiza*. 19:535-548.
- Kretzer, A., Li, Y., Szaro, T., Bruns, T.D. (1996). Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia*. 88:776-785.
- Krpata, D., Peintner, U., Langer, I., Fitz, W.J., Schweiger, P. (2008). Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycol Res*. 112:1069-1079.
- Larsson, E. y Larsson, K.H. (2003). Phylogenetic relationships of russuloid basidiomycetes with emphasis on aphyllophoralean taxa. *Mycologia*. 95:1037-1065.
- Larsson, E., Ryberg, M., Moreau, P.A., Mathiesen, Å.D., Jacobsson, S. (2009). Taxonomy and evolutionary relationships within species of section *Rimosae* (*Inocybe*) based on ITS, LSU and mtSSU sequence data. *Persoonia*. 23:86-98.
- Liou, G.Y. y Tzean, S.S. (1997). Phylogeny of the genus *Arthrotrrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. *Mycologia*. 89:876-884.
- Lodge, D.J., Ammirati, J.F., O'Dell, T.E., Mueller, G.M. (2004). Collecting and describing Macrofungi. En: Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. (Eds.) *Biodiversity of fungi*. Elsevier, Inc. Academic Press, San Diego, pp. 128-158.
- Mankel, A., Kost, G., Kothe, E. (1999). Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma*. *Microbiol Res*. 153:377-388.
- Matheny, P.B. (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). *Mol Phylogenet Evol*. 35:1-20.
- Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol*. 59: 153-163.

- Mayerhofer, M.S., Kernaghan, G., Harper, K.A. (2013). The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza*. 23:119-128.
- Mello, A., Ghignone, S., Vizzini, A., Sechi, C., Ruiu, P., Bonfante, P. (2006). ITS primers for the identification of marketable boletes. *J Biotech*. 121:318-329.
- Menkis, A., Allmer, J., Vasiliauskas, R., Lygis, V., Stenlid, J., Finlay, R. (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycol Res*. 108:965-973.
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F., Stenlid, J., Finlay, R. (2005). Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza*. 16:33-41.
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F. S., Stenström, E., Stenlid, J., Finlay, R. (2006). Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathol*. 55:117-129.
- Menkis, A., Uotila, A., Arhipova, N., Vasaitis, R. (2010). Effects of stump and slash removal on growth and mycorrhization of *Picea abies* seedlings outplanted on a forest clear-cut. *Mycorrhiza*. 20:505-509.
- Menkis, A. y Vasaitis, R. (2011). Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. *Microbial Ecol*. 61:52-63.
- Menkis, A., Lygis, V., Burokiene, D., Vasaitis, R. (2012). Establishment of ectomycorrhiza-inoculated *Pinus sylvestris* seedlings on coastal dunes following a forest fire. *Balt For*. 18:33-40.
- Mondiet, N., Dubois, M.P., Selosse, M.A. (2007). The enigmatic *Squamanita odorata* (Agaricales, Basidiomycota) is parasitic on *Hebeloma mesophaeum*. *Mycol Res*. 111:599-602.
- Moreau, P.A., Peintner, U., Gardes, M. (2006). Phylogeny of the ectomycorrhizal mushroom genus *Alnicola* (Basidiomycota, *Cortinariaceae*) based on rDNA sequences with special emphasis on host specificity and morphological characters. *Mol Phylogenet Evol*. 38:794-807.
- Nara, K. (2006). Pioneer dwarf willow may facilitate tree succession by providing late colonizers with compatible ectomycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert. *New Phytol*. 171:187-198.
- Nouhra, E.R., Caffot, M.L.H., Pastor, N., Crespo, E.M. (2012). The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* forest. *Mycologia*. 104:488-495.
- Nuytinck, J. y Verbeken, A. (2003). *Lactarius sanguifluus* versus *Lactarius vinosus*—Molecular and morphological analyses. *Mycol Prog*. 2:227-234.

- Nuytinck, J., Verbeken, A., Delarue, S., Walley, R. (2003). Systematics of European sequestrate lactarioid Russulaceae with spiny spore ornamentation. *Bel J Bot.* 136:145-153.
- Nuytinck, J., Verbeken, A., Rinaldi, A.C., Leonardi, M., Pacioni, G., Comandini, O. (2004). Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and molecular phylogeny of related European *Lactarius* taxa. *Mycologia.* 96:272-282.
- Nuytinck, J. y Verbeken, A. (2007). Species delimitation and phylogenetic relationships in *Lactarius* section *Deliciosi* in Europe. *Mycol Res.* 111:1285-1297.
- Nygren, C.M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., y Taylor, A.F. (2007). Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 17:241-248.
- Nygren, C.M., Eberhardt, U., Karlsson, M., Parrent, J.L., Lindahl, B.D., Taylor, A.F. (2008). Growth on nitrate and occurrence of nitrate reductase-encoding genes in a phylogenetically diverse range of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 180:875-889.
- Obase, K., Tamai, Y., Yajima, T., Miyamoto, T. (2007). Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usu volcano, Japan. *Mycorrhiza.* 17:209-215.
- Oda, T., Tanaka, C., Tsuda, M. (1999). Molecular phylogeny of Japanese *Amanita* species based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Mycoscience.* 40:57-64.
- Oda, T., Yamazaki, T., Tanaka, C., Terashita, T., Taniguchi, N., Tsuda, M. (2002). *Amanita ibotengutake* sp. nov., a poisonous fungus from Japan. *Mycol Prog.* 1:355-365.
- Oda, T., Tanaka, C., Tsuda, M. (2004). Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. *Mycol Res.* 108:885-896.
- Osmundson, T.W., Robert, V.A., Schoch, C.L., Baker, L.J., Smith, A., Robich, G., Mizzan, L., Garbelotto, M.M. (2013). Filling gaps in biodiversity knowledge for macrofungi: contributions and assessment of an herbarium collection DNA barcode sequencing project. *PloS one.* 8:e62419.
- Palmer, J.M., Lindner, D.L., Volk, T.J. (2008). Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin. *Mycorrhiza.* 19:27-36.
- Pecoraro, L., Girlanda, M., Kull, T., Perini, C., Perotto, S. (2012). Molecular identification of root fungal associates in *Orchis pauciflora* Tenore. *Plant Biosyst.* 146:985-991.
- Phosri, C., Martín, M.P., Watling, R., Jeppson, M., Sihanonth, P. (2009). Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (Gasteromycetes). *Anales Jard Bot. Madrid.* 66:83-91.
- Pickles, B.J., Genney, D.R., Anderson, I.C., Alexander, I.J. (2012). Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. *Mol Ecol.* 21:5110-5123.

- Pressel, S., Ligrone, R., Duckett, J.G., Davis, E.C. (2008). A novel ascomycetous endophytic association in the rhizoids of the leafy liverwort family, *Schistochilaceae* (*Jungermanniiidae*, *Hepaticopsida*). *Am J Bot.* 95:531-541.
- Raja, H. A., Miller, A. N., & Shearer, C. A. (2008). Freshwater ascomycetes: *Aquapoterium pinicola*, a new genus and species of *Helotiales* (*Leotiomycetes*) from Florida. *Mycologia.* 100:141-148.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61:539-542.
- Rusevska, K., Karadelev, M., Phosri, C., Duenas, M., Watling, R., Martín, M.P. (2014). Rechecking of the genus *Scleroderma* (Gasteromycetes) from Macedonia using barcoding approach. *Turk J Bot.* 38:375-385.
- Ryberg, M., Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Töpel, M., Jacobsson, S., Larsson, E. (2008). Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evol Biol.* 8:50.
- Saenz, G.S. y Taylor, J.W. (1999). Phylogeny of the *Erysiphales* (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Can J Bot.* 77:150-168.
- Sanon, K.B., Bâ, A.M., Delaruelle, C., Duponnois, R., Martin, F. (2009). Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinioideae legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. *Mycorrhiza.* 19:571-584.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen W., and Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *P Natl Acad Sci.* 109:6241-6246.
- Schubert, R., Raidl, S., Funk, R., Bahnweg, G., Müller-Starck, G., Agerer, R. (2003). Quantitative detection of agar-cultivated and rhizotron-grown *Piloderma croceum* Erikss. & Hjortst. by ITS1-based fluorescent PCR. *Mycorrhiza.* 13:159-165.
- Shefferson, R.P., WEIB, M., Kull, T., Taylor, D. (2005). High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Mol Ecol.* 14:613-626.
- Slot, J.C., Hallstrom, K.N., Matheny, P.B., Hosaka, K., Mueller, G., Robertson, D.L., Hibbett, D.S. (2010). Phylogenetic, structural and functional diversification of nitrate transporters in three ecologically diverse clades of mushroom-forming fungi. *Fungal Ecol.* 3:160-177.
- Soukupová, L., Hřelová, H., Gryndlerová, H., Merhautová, V., Gryndler, M. (2008). Alkali-extractable soil organic matter: an important factor affecting the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol.* 40:37-43.

- Stenström, E., Ndobe, N.E., Jonsson, M., Stenlid, J., Menkis, A. (2014). Root-associated fungi of healthy-looking *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings in Swedish forest nurseries. *Scand J Forest Res.* 29:12-21.
- Stubbe, D., Nuytinck, J., Verbeken, A. (2010). Critical assessment of the *Lactarius gerardii* species complex (*Russulales*). *Fungal Biol.* 114:271-283.
- Šutara, J. (1991). *Paxillus albidulus*, a new species of the family *Paxillaceae*. *Ceská Mykol.* 45:129-133.
- Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10:512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-2739.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures Math Life Sci.* 17:57-86.
- Tedersoo, L., Pärtel, K., Jairus, T., Gates, G., Pöldmaa, K., Tamm, H. (2009). Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environ Microbiol.* 11:3166-3178.
- Tejesvi, M.V., Sauvola, T., Pirttilä, A.M., Ruotsalainen, A.L. (2013). Neighboring *Deschampsia flexuosa* and *Trientalis europaea* harbor contrasting root fungal endophytic communities. *Mycorrhiza.* 23:1-10.
- Terhonen, E., Keriö, S., Sun, H., Asiegbu, F.O. (2014). Endophytic fungi of Norway spruce roots in boreal pristine mire, drained peatland and mineral soil and their inhibitory effect on *Heterobasidion parviporum* *in vitro*. *Fungal Ecol.* 9:17-26.
- Tourtellot, S.G. (2013). The impact of transgenic American chestnuts (*Castanea dentata*) on ectomycorrhizal fungi in open-field and mature forest sites. State University of New York Col. of Environmental Science & Forestry. 151 pp.
- Turnau, K., Henriques, F.S., Anielska, T., Renker, C., Buscot, F. (2007). Metal uptake and detoxification mechanisms in *Erica andevalensis* growing in a pyrite mine tailing. *Environ Exp Bot.* 61:117-123.
- Untereiner, W.A., Naveau, F.A., Bachewich, J., Angus, A. (2006). Evolutionary relationships of *Hyphodiscus hymeniophilus* (anamorph *Catenulifera rhodogena*) inferred from β -tubulin and nuclear ribosomal DNA sequences. *Botany.* 84:243-253.
- Upton, R., Read, D.J., Newsham, K.K. (2007). Widespread association between the ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* and a leafy liverwort in the maritime and sub-Antarctic. *New Phytol.* 176:460-471.
- Ursic M. y Peterson R.L. (1997). Morphological and anatomical characterisation of ectomycorrhizas and ectendomycorrhizas on *Pinus strobus* seedlings in a southern Ontario nursery. *Can J Bot.* 75: 2057–2072

- Vasiliauskas, R., Menkis, A., Finlay, R.D., Stenlid, J. (2007). Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytol.* 174:441-446.
- Vellinga, E.C., Blanchard, E.P., Kelly, S., Contu, M. (2012). *Paxillus albidulus*, *P. ammoniavirescens*, and *P. validus* revisited. *Mycotaxon.* 119:351-359.
- Vesterholt, J. (1989). A revision of *Hebeloma* sect. *Indusiata* in the Nordic countries. *Nord J Bot.* 9:289-319.
- Vrålstad, T., Myhre, E., Schumacher, T. (2002a). Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytol.* 155:131-148.
- Vrålstad, T., Schumacher, T., Taylor, A.F. (2002b). Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytol.* 153:143-152.
- Vohnik, M., Fendrych, M., Kolarik, M., Gryndler, M., Hrrselova, H., Albrechtova, J., Vosatka, M. (2007). The ascomycete *Meliniomyces variabilis* isolated from a sporocarp of *Hydnotrya tulasnei* (Pezizales) intracellularly colonises roots of ecto-and ericoid mycorrhizal host plants. *Ceská Mykol.* 59:215.
- Vohnik, M., Mrnka, L., Lukešová, T., Bruzone, M.C., Kohout, P., Fehrer, J. (2013). The cultivable endophytic community of Norway spruce ectomycorrhizas from microhabitats lacking ericaceous hosts is dominated by ericoid mycorrhizal *Meliniomyces variabilis*. *Fungal Ecol.* 6:281-292.
- Wang, Z., Binder, M., Hibbett, D.S. (2005). Life history and systematics of the aquatic discomycete *Mitrula* (Helotiales, Ascomycota) based on cultural, morphological, and molecular studies. *Am J Bot.* 92:1565-1574.
- Wang, Q. y Guo, L.D. (2010). Ectomycorrhizal community composition of *Pinus tabulaeformis* assessed by ITS-RFLP and ITS sequences. *Botany.* 88:590-595.
- Walbert, K., Ramsfield, T.D., Ridgway, H.J., Jones, E.E. (2010). Ectomycorrhizal species associated with *Pinus radiata* in New Zealand including novel associations determined by molecular analysis. *Mycorrhiza.* 20:209-215.
- Wilcox, H.E. y Wang, C.J.K. (1987). Ectomycorrhizal and ectendomycorrhizal associations of *Phialophora finlandia* with *Pinus resinosa*, *Picea rubens*, and *Betula alleghaniensis*. *Can J Forest Res.* 17:976-990.
- Wilson, B.J., Addy, H.D., Tsuneda, A., Hambleton, S., Currah, R.S. (2004). *Phialocephala sphaeroides* sp. nov., a new species among the dark septate endophytes from a boreal wetland in Canada. *Can J Bot.* 82:607-617.
- Wilson, A.W., Binder, M., Hibbett, D.S. (2011). Effects of gasteroid fruiting body morphology on diversification rates in three independent clades of fungi estimated using binary state speciation and extinction analysis. *Evolution.* 65:1305-1322.

- Yurkov, A., Krüger, D., Begerow, D., Arnold, N., Tarkka, M.T. (2012). Basidiomycetous yeasts from Boletales fruiting bodies and their interactions with the mycoparasite *Sepedonium chrysospermum* and the host fungus *Paxillus*. *Microbial Ecol.* 63:295-303.
- Zhang, Y.H. y Zhuang, W.Y. (2004). Phylogenetic relationships of some members in the genus *Hymenoscyphus* (Ascomycetes, Helotiales). *Nova Hedwigia.* 78:475-484.
- Zhang, C., Xu, X.E., Liu, J., He, M., Wang, W., Wang, Y., Ji, K. (2013). *Scleroderma yunnanense*, a new species from South China. *Mycotaxon.* 125:193-200.
- Zhang, J., Taniguchi, T., Xu, M., Du, S., Liu, G.B., Yamanaka, N. (2014). Ectomycorrhizal fungal communities of *Quercus liaotungensis* along different successional stands on the Loess Plateau, China. *J For Res.* 19:395-403.
- Zhao, Y.J., Hosoya, T., Baral, H.O., Hosaka, K., Kakishima, M. (2013). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon.* 122:25-41.
- Zhong, Z. y Pfister, D.H. (2004). Phylogenetic relationships among species of *Leotia* (Leotiales) based on ITS and RPB2 sequences. *Mycological Progress*,3:237-246.



CAPÍTULO 6

AISLAMIENTO, CULTIVO Y MICORRIZACIÓN CONTROLADA DE HONGOS ECTOMICORRÍDICOS DE ZONAS CONTAMINADAS

6.1. Introducción

Uno de los aspectos más importantes para la selección de hongos micorrícicos es la posibilidad de manejarlos en laboratorio, aislarlos y producirlos en cultivo puro. Este carácter es importante para desarrollar protocolos que nos permita obtener inóculo en grandes cantidades con el objeto de incrementar la producción de planta micorrizada para su empleo en programas de fitorremediación o reforestación de zonas degradadas. El éxito de la aplicación de hongos micorrícicos en reforestación, dependerá en gran medida, de la disponibilidad de un conjunto de hongos seleccionados capaces de mejorar la productividad forestal en distintas condiciones ambientales (Pera, 1992).

En numerosos hongos ectomicorrícicos la producción de inóculo miceliar puede presentar algunos problemas como mantener un crecimiento adecuado, heterogeneidad de crecimiento entre subcultivos, necesidad de manejar grandes volúmenes de inóculo en condiciones asépticas y garantizar la supervivencia del mismo en el vivero. La diferente respuesta de crecimiento, de un mismo aislamiento fúngico en un determinado sistema de cultivo, plantea serios problemas de planificación y coordinación a la hora de poner en marcha un programa de micorrización controlada en un vivero industrial. Este hecho hace necesario determinar las condiciones nutricionales idóneas para cada hongo y las diferentes interacciones que su crecimiento provoca en diferentes tipos de sustratos empleados.

En el proceso de selección fúngica es necesario tener en cuenta una serie de criterios que, teniendo en cuenta a diferentes autores (Duñabeitia, 1993; Harvey *et al.*, 1988; Kropp y Langlois, 1990; Le Tacon, *et al.* 1985; Marx y Cordell, 1989; Molina y Trappe, 1982), podemos resumir en los siguientes apartados:

- Ha de ser fácil de aislar y crecer bien en cultivo puro, sin necesidad de medios complejos. Su mantenimiento en condiciones viables no debe presentar problemas.
- Debe tolerar las manipulaciones necesarias para su producción y aplicación como inóculo. Los aislamientos deberían mantener su viabilidad si se almacenan en condiciones adecuadas durante varias semanas.
- Debe de ser efectivo como inóculo; por tanto, tiene que ser compatible con la especie forestal que nos interese producir. Asimismo, es conveniente que forme ectomicorizas con otros hospedantes además del deseado.
- Tiene que beneficiar al hospedante, en sus variables biométricas y/o fisiológicas, incrementando la supervivencia y crecimiento de los plantones tras el trasplante.
- Adicionalmente la producción de cordones miceliares o rizomorfos y esclerocios por parte del hongo resulta muy interesante, ya que la toma de agua, nutrientes y la supervivencia en condiciones adversas están muy relacionadas con la producción de esas estructuras.

Por tanto, el aislamiento, mantenimiento y cultivo de diferentes hongos ectomicorrícicos en cultivo puro, y su posterior empleo como inóculo para la formación efectiva de micorizas en laboratorio, es clave para la investigación y empleo de estos

organismos ya que permite conocer sus características fisiológicas y ecológicas así como su comportamiento durante su manipulación.

Por todo ello, el objetivo de esta parte del trabajo fue el aislamiento y optimización del cultivo de hongos adaptados a zonas altamente contaminadas con metales pesados, así como la micorrización de *in vitro* de diferentes especies forestales con estas especies. Todo ello acompañado del estudio en profundidad de *Paxillus ammoniavirescens* como especie modelo y en donde se estudió la biogénesis y manipulación de estructuras de resistencia (esclerocios) y su potencial uso como inóculo.

6.2. Material y Métodos

6.2.1. Aislamiento

Los aislamientos se realizaron a partir de carpóforos procedentes de dos emplazamientos: SIA COOPER S.A.-KME LOCSA y Nitrastur. Como ya se comentó en el Capítulo 2, en 2003 se realizó el aislamiento de *P. ammoniavirescens* (Pa L) (Fernández *et al.*, 2008), a partir de cuerpos fructíferos recolectados en la escombrera de las empresas SIA COOPER S.A.-KME LOCSA. Este aislamiento fue utilizado como modelo para todos los ensayos *in vitro*. El resto de aislamientos proceden de esporocarpos recolectados entre los años 2011-2013 en Nitrastur. Las especies de las que se trató de realizar el aislamiento fueron: *Amanita muscaria*, *Cortinarius alboviolaceus*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. sinapizans*, *Laccaria laccata*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *Paxillus cuprinus*, *P. ammoniavirescens* (Pa N), *Scleroderma citrinum*, *Tricholoma cingulatum* y *T. fulvum*

El aislamiento de los hongos en cultivo puro se realizó, en todos los casos, a partir de los tejidos internos del esporocarpo, en un ambiente estéril trabajando con cámara de flujo laminar. En el caso del Gasteromycete *S. citrinum*, el aislamiento se realizó de la zona central de la gleba y en el resto de las especies se hicieron a partir de fragmentos de tejido no expuestos al exterior, en la zona situada entre el himenóforo y la cutícula del sombrero.

El medio de cultivo utilizado es el Medio Merlin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969)(Tabla 6.1.), a pH 5,6, esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Los fragmentos de tejido fúngico se transfirieron a placas Petri con el medio de cultivo (20 ml) y se incubaron a una temperatura de 23 °C y humedad relativa del 60% en oscuridad. Para verificar que estas condiciones se mantenían constantes, se realizó un registro de ambos parámetros con un sensor termohigrométrico Ebro modelo EBI 20. Se revisaron diariamente todos los aislamientos, eliminando todas las placas que presentaban contaminación. Aquellos hongos que crecían se repicaban, transfiriendo pequeños fragmentos de micelio del borde de la colonia a placas Petri con medio fresco.

6.2.2. Efecto del medio de cultivo en la producción de *P. ammoniavirescens* (Pa L)

Se valoró la capacidad de crecimiento de esta especie en dos ensayos diferentes. En el primero se probaron cuatro medios de cultivo que difieren considerablemente en contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas. Para ello, a partir de 4 cultivos puros bien establecidos y conservados en oscuridad a 23 °C en medio MMN, se procedió a sembrar placas Petri con los medios de cultivo: MMN, BAF (Moser, 1960), MFM (Danell, 1994) y MEPA (Bormann *et al.*, 1999). En el segundo se utilizaron el MMN, el MS (Murashige y Skoog, 1962), así como en dos modificaciones del mismo, el denominado ½ MS en el que el Calcio y los

macronutrientes están reducidos a la mitad, y el ½ N MS, en el que solo se redujo a la mitad las fuentes de Nitrógeno. La composición de estos medios se puede ver en la Tabla 6.1.

En ambos ensayos los medios de cultivo, todos ellos a pH 5,6, se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, y posteriormente se dispensaron 20 ml en placas Petri en cámara de flujo laminar, manteniendo las condiciones de asepsia. Con ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro se tomaron fragmentos del borde de la colonia y se colocaron en las placas Petri con los medios de cultivo fresco. Para el primer ensayo se sembraron 10 placas por cada medio de cultivo, que se incubaron a 23 °C en oscuridad y se evaluaron a los 60 días. El crecimiento se cuantificó mediante la medición del área que ocupan las colonias fúngicas en los distintos medios de cultivo, utilizando el programa de análisis de imágenes Image-Pro Plus 4.5.

Tabla 6.1.: Composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de los hongos ectomicorrícicos.

	BAF	MEPA	MFM	MMN	MS	½ MS	½ N MS
MACRONUTRIENTES	g/l						
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,10		0,026	0,05	0,44	0,22	0,44
NaCl			0,02	0,025			
KH ₂ PO ₄	0,50		0,20	0,50	0,17	0,085	0,17
(NH ₄) ₂ HPO ₄				0,25			
NH ₄ NO ₃					1,65	0,825	0,825
NH ₄ Cl			0,58				
KNO ₃					1,90	0,95	0,95
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50		0,10	0,15	0,37	0,185	0,37
MICRONUTRIENTES	mg/l						
MnSO ₄ H ₂ O	5,60		0,85		16,9	16,9	16,9
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1		1,435		8,60	8,60	8,60
KI			0,375		0,83	0,83	0,83
H ₃ BO ₃			0,315		6,20	6,20	6,20
CoCl ₂ 6H ₂ O			0,0125		0,025	0,025	0,025
NaMo ₄ 2H ₂ O			0,0125		0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O			0,0125		0,025	0,025	0,025
HIERRO	mg/l						
Cl ₃ Fe 7H ₂ O	100		10	10			
FeSO ₄ 7H ₂ O					2,785	2,785	2,785
Na ₂ EDTA					3,72	3,72	3,72
VITAMINAS Y AC. ORGÁNICOS	mg/l						
Tiamina	0,05		0,10	0,05	0,10	0,10	0,10
Biotina	1 10 ⁻³		0,025				
Myo-inositol	0,05		10		10	10	10
Piridoxina			1		0,05	0,05	0,05
Ac. Nicotínico					0,05	0,05	0,05
Glicina					2	2	2
Rivoflavina			1				
Nicotinamida			1				
Ac. p-aminobenzoico			1				
Ac. pantoténico			1				
Ac. succínico			590				
Ac. fólico							
COMPLEJOS	g/l						
Extracto de malta		30		3			
Extracto de levadura	0,20						
Peptona de caseína	2	3					
AZUCARES	g/l						
Glucosa	30		2,20	10			
Sacarosa					30	30	30
Fructosa			2				
AGAR	15	15	15	15	15	15	15

Para el segundo se sembraron 10 placas por cada medio de cultivo, que se incubaron a 23 °C en oscuridad, y en este caso se evaluó el aérea de cada colonia mediante análisis de imagen cada semana hasta un total de 5 semanas, para así poder ver las diferencias semana a semana entre los medios y poder calcular las curvas y velocidades de crecimiento para cada uno de ellos. Al término de las 5 semanas se valoró el peso seco de cada colonia. Para ello se licuó el medio de cultivo, colocando cada placa en agua hirviendo hasta eliminar cualquier resto de agar. Posteriormente el micelio se lava y filtra mediante la ayuda de una muselina. Cada colonia se colocó por separado sobre placas de cristal que se secaron en estufa de aire forzado durante 48 horas a 75 °C.

6.2.3. Variación del pH en diferentes medios causado por el crecimiento de *P. ammoniavirescens* (Pa L)

Se seleccionaron los medios de cultivo MMN, MS y ½ MS, para ver si existe una variación del pH dependiendo del medio de cultivo causado por el crecimiento del aislamiento Pa L. Para ello se ajustó el pH de los 3 medios sin autoclavar a 5,6. Posteriormente estos medios se autoclavaron a 120 °C durante 20 minutos y se dispensaron, en 10 placas Petri con 20 ml para cada medio, en cámara de flujo laminar. Una vez solidificado se midió el pH en 2 placas (3 puntos por placa) de cada medio para ver como afectaba el proceso de autoclavado. De las placas restantes, 6 se sembraron colocando un inóculo de 1 cm de diámetro y se dejaron crecer a 23 °C en oscuridad hasta alcanzar la colonia un diámetro de 5 cm, momento en el que se realizaron las mediciones. Adicionalmente se dejaron otras 2 placas control de cada medio sin inóculo, en las que se midió el pH al cabo de 5 semanas para determinar si existe variación del medio sin crecimiento.

Para realizar las mediciones de pH de las placas inoculadas se elaboró una plantilla de las placas Petri de 8,6 cm de diámetro (Fig.6.1.), en la cual se mostraban las 3 zonas donde se realizaría la medición: interior del micelio, borde del micelio y parte externa sin crecimiento. En cada zona se midieron 4 puntos.

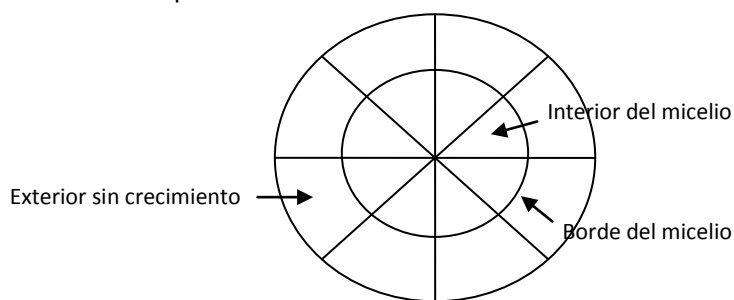


Fig.6.1.: Esquema de una placa Petri con una colonia fúngica mostrando las zonas de medición de pH.

6.2.4. Crecimiento de los hongos de Nitrastur en medio MS

A partir de los resultados obtenidos con Pa L, se decidió crecer los hongos aislados en Nitrastur en el medio MS; especialmente aquellos que presentaban escaso crecimiento como *A. muscaria*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* (Pa N), *S. citrinum* y *T. fulvum*. La preparación del medio de cultivo y la inoculación se realizó de la misma manera que la descrita anteriormente; todo ello manteniendo las condiciones de esterilidad.

6.2.5. Efecto del medio de cultivo en la producción de *P. cuprinus*

Debido a que *P. cuprinus* es una especie recientemente descrita de la que se tiene un escaso conocimiento, y viendo el elevado contenido en metales encontrado en sus cuerpos

fructíferos (Capítulo 3), se decidió profundizar en detalle en la cinética de su crecimiento e intentar optimizar su producción *in vitro*. Para ello y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con *P. ammoniavirescens*, se escogieron los medios MMN, MS y ½ MS para su cultivo. De igual manera que en los ensayos anteriores los medios de cultivo, todos ellos a pH 5,6, se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, y posteriormente se dispensaron 20 ml en placas Petri en cámara de flujo laminar, manteniendo las condiciones de asepsia. Con ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro se tomaron fragmentos del borde de la colonia y se colocaron en las placas Petri con los 3 medios de cultivo. Se sembraron 15 placas por cada medio de cultivo que se incubaron a 23 °C en oscuridad y, al igual que en caso de Pa L, se evaluó semanalmente el aérea de cada colonia mediante análisis de imagen hasta un total de 5 semanas, para así poder ver las diferencias entre los medios y poder calcular las curvas y velocidades de crecimiento. Asimismo al término de las 5 semanas se valoró el peso seco de cada colonia realizando el mismo proceso que para Pa L.

6.2.6. Material vegetal

El material vegetal utilizado fueron clones de *Betula celtiberica* Rothm y Vasc, *Salix atrocinerea* Brot. y *Populus nigra* L. procedentes de propagación *in vitro*, previamente seleccionados por su capacidad hiperacumuladora (Fernández *et al.*, 2008). El medio de cultivo utilizado para su crecimiento fue el medio ½ MS (Tabla 6.1.), modificando el aporte de hierro, que en este caso procede del quelato Sequestrene® (0,2 g/l), reduciéndose la cantidad de sacarosa a 20 g/l y el agar a 7 g/l. El crecimiento *in vitro* de las plantas se realizó en tarros de cristal de 250 ml de capacidad con 35 ml del medio de cultivo a una temperatura constante de 23 °C y bajo un fotoperiodo de 16 horas.

6.2.7. Síntesis de micorrizas *in vitro*

Para la micorrización *in vitro* se emplearon tres sistemas:

- Micorrización en tarro sobre medio de cultivo gelificado.
- Micorrización en tubo sobre medio de cultivo gelificado inclinado.
- Micorrización en tarro sobre medio de cultivo en sustrato.

En la micorrización en tarro sobre medio de cultivo gelificado, la inoculación se realizó colocando directamente sobre la superficie del medio de cultivo, en los tarros en donde se estaban propagando los árboles, 2 inóculos fúngicos de 1 cm de diámetro tomados del borde de una colonia en crecimiento activo. Los hongos ensayados fueron: *A. muscaria*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* (Pa L), *P. cuprinus*, *S. citrinum*, *T. fulvum* y *S. citrinum*. En el caso de este último hongo, la inoculación solo se hizo en *B. celtiberica*. Para cada combinación hongo-planta se realizaron 10 replicas, manteniendo los cultivos duales durante 2 meses a 23 °C y un fotoperiodo de 16 horas. Excepcionalmente, en la combinación Pa L-Abedul se emplearon 100 replicas con el objetivo de determinar las tasas de micorrización y valorar si este sistema podría utilizarse para producir un número elevado de plantas micorrizadas. Las plantas inoculadas se revisaron semanalmente durante dos meses.

La micorrización en tubo sobre medio de cultivo gelificado inclinado se ensayo con los hongos Pa L y *P. cuprinus* y las tres especies forestales. En este caso se emplearon tubos de ensayo Pyrex® de 250 mm de alto y 26 mm de diámetro. En condiciones estériles, cada tubo se rellena con 20 ml del medio ½ MS, empleado en la micropropagación de los árboles, y se deja solidificar por el sistema de tubo inclinado. Una vez solidificado el medio, se introduce la planta enraizada en el tubo y, al igual que en el caso anterior, se inocula con 2 fragmentos de 1 cm de diámetro. La base de los tubos se rodeó con un plástico negro para proteger el sistema

radicular de un posible efecto negativo por parte de la luz. El cultivo dual tuvo lugar a 23° C y un fotoperiodo de 16 horas.

La micorrización en tarro sobre medio de cultivo en sustrato se ensayó en inoculaciones de *P. cuprinus* en abedul y sauce y con *S. citrinum* en abedul. Se utilizaron frascos de cultivo de 700 ml rellenos de 250 ml de una mezcla de turba-sustrato inorgánico poroso en la proporción 1:10 (v: v) y 150 ml de medio de cultivo MS a un pH inicial de 5,6. Para la mezcla de turba-sustrato inorgánico poroso, utilizamos turba sin abonar TSK[®]1 tamizada hasta conseguir una granulometría de entre 2 y 3 mm. Como sustrato inorgánico poroso utilizamos Vermiculita o Perlita tamizada con idéntica granulometría que la turba. La inoculación se realizó transfiriendo en condiciones asépticas, 5 discos de micelio de 1 cm de diámetro a cada tarro. El crecimiento fúngico se realizó a 23° C en oscuridad. Cuando se observa crecimiento del hongo en el sustrato, se introduce la planta procedente de la cadena de micropropagación y se cultiva a una temperatura de 23° C y bajo un fotoperiodo de 16 horas.

6.2.8. Descripción Macro y Microscópica de las micorrizas

La descripción macroscópica de los diferentes ectomicorrizas producidas se realizó siguiendo la misma metodología que la descrita en el Capítulo 4. Para ello se utilizaron las fichas identificativas (Apéndice 2), elaboradas en base a la metodológica indicada por Agerer (1990) y Goodman *et al.* (1996). Se realizaron 20 mediciones de sus dimensiones (longitud del sistema y de la punta, ancho de la punta, eje mayor y base). Cada morfotipo se recogió en tubos eppendorfs[®] de 1,5 ml, fijándolo en FAA (180 ml etanol, 10 ml de formol y 10 ml de ácido acético) para su posterior observación microscópica.

Para la descripción microscópica se realizaron cortes de entre 10 - 30 µm de espesor con un criostato Leica modelo CM1510-1, y su caracterización histológica se realizó mediante fichas (Apéndice 3) elaboradas basándonos en la metodológica indicada por Goodman *et al.* (1996) e Ingleby *et al.* (1990). Parte de estos cortes se tiñeron colocándolos directamente en un portaobjetos sobre unas gotas de azul de algodón al 0,05% en lactoglicerol (ácido láctico, glicerina, dH₂O; en proporción 1:1:1 (V/V)), y otra parte dejándolos en azul de toluidina al 0,2% durante 20 minutos, para posteriormente lavarlos con lactoglicerol. Para la observación microscópica de estos últimos, los cortes se montaron con lactoglicerol. Se realizaron 25 medidas de cada una de las capas del manto observadas.

6.2.9. Esclerocios de *P. ammoniavirescens*

Los esclerocios son unas estructuras de resistencia producidas por muchos hongos. Sobreviven a condiciones desfavorables para el micelio (Willems, 1971) y germinan para producir micelio, esporas asexuales o esporocarpos productores de esporas sexuales (Coley-Smith y Cooke, 1971). Debido a la producción de estas estructuras por parte de varias especies de hongos y a su potencial uso como inóculo, se decidió estudiarlos con más detalle. Para ello se tomó al aislamiento Pa L como especie modelo, por ser el que mayor número de estas estructuras presentaba y porque no tenemos constancia de que se haya estudiado los esclerocios de esta especie.

Dentro del desarrollo de un esclerocio de Pa L definimos 2 estadios: Esclerocios inmaduros y esclerocios maduros. Los esclerocios inmaduros son de color inicialmente blanco transformándose gradualmente en crema. Los esclerocios maduros se consideran aquellos que no muestran un incremento de tamaño y poseen una corteza negra visible debajo de una

trama exterior de hifas. Para el tamaño de estos dos estadios se realizaron 50 mediciones de los esclerocios inmaduros y 75 de los maduros.

6.2.9.1. Estructura del esclerocio

Para estudiar la estructura interna de estas estructuras, se recolectaron esclerocios maduros e inmaduros de diferentes tamaños de la superficie del micelio creciendo en medio MMN a 23° C, y se fijaron en FAA (etanol, formol y ácido acético; 18:1:1 (v/v)). La descripción microscópica se realizó a partir de cortes de 10 a 30 µm de espesor realizados con un criostato Leica modelo CM1510-1. Los cortes se tiñeron con azul de algodón en lactoglicerol o con azul de Toluidina durante 1 hora, para posteriormente lavarlos con lactoglicerol. Se realizaron 50 mediciones de cada una de las capas que se detectan en los esclerocios.

En esclerocios maduros, para determinar la presencia de mucopolisácaridos ácidos, se utilizó la tinción de Azul de alcian en ácido acético al 3%, a pH 2,5 (Lev y Spicer, 1964); tiñendo los cortes durante 30 min y montándolos posteriormente en lactoglicerol. Para la localización de lípidos se utilizó la tinción Sudan Black B en etanol al 70% (Pearse, 1968). Las secciones se tiñeron durante 5 minutos en este colorante y se montaron posteriormente en lactoglicerol. Para la determinación de los acumulos proteicos se utilizó la tinción de Fucsina ácida (Grenville *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1991), dejándolas teñir durante 10 minutos, seguido de 10 minutos de lavado en lactoglicerol.

6.2.9.2. Esclerocios como fuente de inóculo.

La capacidad de los esclerocios como inóculo fúngico se comprobó comparando el crecimiento de micelio originado de 15 de estas estructuras, sembradas en placas Petri con 15 ml de medio de cultivo MMN, con el originados a partir de otros tantos discos de micelio de 0,5 cm de diámetro. Todos los cultivos se mantuvieron a 23° C en oscuridad y se evaluaron a los 2 meses.

Se estudio la capacidad de los esclerocios maduros de actuar como inóculo micorrízico. Para ello se utilizó el sistema previamente descrito de micorrización en tarros de cultivo de 250 ml con *B. celtiberica*. Se inocularon 3 esclerocios por tarro para un total de 10 replicas y como control se inocularon otros 10 tarros con 2 fragmentos micelio de 1 cm de diámetro. Su cultivo tuvo lugar a una temperatura de 23° C y bajo un fotoperiodo de 16 horas; evaluándose los resultados al cabo de 1 mes.

6.2.9.3. Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de esclerocios.

Para comprobar el efecto de las características químicas del medio de cultivo y la temperatura de desarrollo del micelio en la producción de esclerocios se realizaron dos ensayos.

En el primer ensayo se cultivó el hongo en tres concentraciones de este nitrógeno a 3 temperaturas diferentes. Como medio de cultivo se utilizó el medio MMN con tres concentraciones de N, aportado en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Se empleó la concentración de 1,89 mmol/l de esta sal, que es la habitual en el medio de cultivo MMN, el doble 3,78 mmol/l y la mitad, 0,94 mmol/l. Para cada concentración de nitrógeno se emplearon 30 placas Petri inoculadas con un disco de micelio de 1 cm de diámetro y se mantuvieron a 23° C durante 10 semanas. Pasado este tiempo, y para comprobar si la disminución de la temperatura incrementa la producción de esclerocios, se colocaron 10 placas de cada concentración de nitrógeno a 10° C y a 8° C y a durante 2 semanas. Las otras 10 placas restantes de cada

concentración se mantuvieron como control a 23° C. En este ensayo tendremos un total de 90 placas con 10 replicas de cada una de las tres condiciones de concentración de nitrógeno y temperatura

En un segundo ensayo se comprobó la capacidad de formación de esclerocios en los medios MS y ½ MS a 23 y a 8° C. Se emplearon 20 placas de Petri, inoculadas con un disco de micelio de 1 cm de diámetro por cada medio de cultivo, y se mantuvieron a 23° C durante 3 semanas. Posteriormente, se colocaron 10 placas de cada medio a 8° C durante 2 semanas; dejando otras 10 a 23° C como control. Al cabo de este tiempo se cuantificó la producción de esclerocios y se mantuvieron todos los cultivos 2 semanas más a 23° C para ver su desarrollo.

6.2.10. Tratamiento estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0. Los resultados se examinaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) y como Test a posteriori se utilizó la prueba DMS equivalente a varias pruebas t individuales entre todos los pares de grupos para un nivel de significación del 95 % ($p = 0,05$), o al 99 % ($p = 0,01$) para el caso de la comparativa de los controles de pH con las placas en crecimiento. En el caso del análisis de porcentajes se empleo el z-test comparando dos a dos los diferentes tratamientos para un nivel de significación del 95 % ($p = 0,05$), y aplicando el factor de corrección de Yates.

6.3. Resultados

6.3.1. Aislamiento

De todas las especies fúngicas que se trataron de aislar procedentes de Nitrastur se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 6.2.:

Tabla 6.2.: Especies ectomicorrícicas que se intentaron aislar en condiciones *in vitro* en laboratorio. + indica crecimiento, - indica no crecimiento en el medio MMN.

Espece	Aislamiento	Observaciones
<i>Amanita muscaria</i>	+	Micelio blanco algodonoso, aéreo en toda la colonia y muy denso. A medida que se subcultiva su capacidad de crecimiento va disminuyendo hasta dejar de crecer.
<i>Cortinarius alboviolaceus</i>	+	Micelio blanco inicialmente adquiriendo una coloración violácea al cabo de 1 semana. Al subcultivar los aislamientos la morfología de la colonias cambió volviéndose irregular con micelio blanco aéreo y sin fíbulas, debido a una contaminación por un segundo hongo.
<i>Hebeloma mesopaheum</i>	-	Crecimiento nulo
<i>H. sinapizans</i>	-	Crecimiento nulo
<i>Laccaria laccata</i>	+	Micelio blanco denso con colonia de forma regular. Microscópicamente se observan fíbulas. Al subcultivar los aislamientos la morfología de la colonias cambió volviéndose irregular con micelio aéreo y sin fíbulas, debido a una contaminación por un segundo hongo.
<i>Lactarius pubescens</i>	+	Micelio color crema anaranjado poco denso y de forma irregular. Desarrollan hifas aéreas ramificadas. Las colonias obtenidas no llegaron a superar 1 cm de diámetro y no crecieron en el siguiente subcultivo.
<i>Leccinum scabrum</i>	+	Micelio blanco algodonoso tomando una coloración amarronado con el tiempo. Crecimiento muy lento con un largo periodo de latencia, al principio denso y regular para posteriormente disminuir su densidad y volverse irregular.
<i>Paxillus ammoniavirescens</i> (Pa N)	+	Micelio blanco parduzco, que se oscurece con el tiempo hasta alcanza una coloración marrón claro. Crecimiento rápido y denso que constituye colonias simétricas. Mismas características macroscópicas y comportamiento en medio de cultivo que el aislamiento de Pa L
<i>P. cuprinus</i>	+	Micelio ocre marrón, que se oscurece rápidamente hasta llegar a ser marrón oscuro. Crecimiento muy denso y rápido hasta alcanzar los 4-5 cm de diámetro.
<i>Scleroderma citrinum</i>	+	Micelio blanco algodonoso, muy denso y de crecimiento lento constituyendo colonias regulares. A cabo de 1 semana la coloración se torna amarillenta.
<i>Tricholoma cingulatum</i>	-	Crecimiento nulo
<i>T. fulvum</i>	+	Micelio denso de color crema que se vuelve color marrón oscuro con el tiempo. Crecimiento lento, regular al principio para posteriormente formar hendiduras radiales.

Los datos del sensor termohigrométrico nos indican que las condiciones de cultivo (humedad y temperatura) se mantuvieron constantes.

6.3.2. Efecto del medio de cultivo en la producción de *P. ammoniavirescens* (Pa L)

Tradicionalmente para evaluar la capacidad de crecimiento de una especie fúngica, se emplea la medición del diámetro de la colonia, lo que puede dar lugar a errores, ya que no todas las colonias presentan un crecimiento radial regular. Para resolver este problema se diseñó una rutina específica en el programa informático de análisis de imágenes Image-Pro Plus 4.5. que permitió evaluar de forma automática, independientemente de su simetría, el área de crecimiento de cada colonia a partir de imágenes digitalizadas (Fig.6.2.).

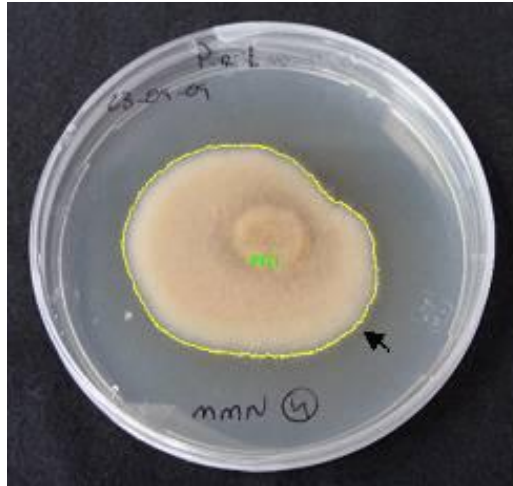


Fig.6.2.: Fotografías de la una colonia de *P. amoniavirescens* (Pa L) cuantificadas por análisis de imagen a los 15 días de cultivo. La flecha indica el contorno de la colonia analizado por el programa y utilizado para la cuantificación.

Los resultados obtenidos del crecimiento de esta especie a los 60 días en los medios BAF, MEPA, MFM Y MMN se muestran en la Fig.6.3.:

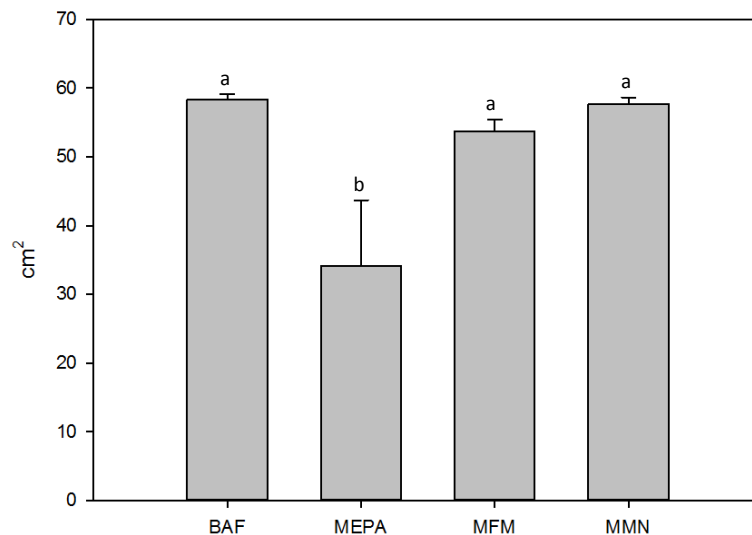


Fig.6.3.: Medias \pm error estándar de las áreas de las colonias fúngicas de Pa L expresada en cm^2 , tras 60 días de crecimiento en los cuatro medios diferentes. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS)

Cabe destacar que las diferencias observadas entre los medios BAF, MFM y MMN con respecto a MEPA, son debidas a la variabilidad en el comportamiento del inóculo en este medio. Todos los inóculos proceden de la misma placa, y en este medio la mitad crecen cubriendo toda la placa mientras que la otra mitad no presentan ningún tipo de crecimiento. Es por ello que descartamos este medio.

Dado que para el cultivo *in vitro* de las plantas que se van a micorrizar, se emplea el medio MS, habitual en la micropropagación vegetal, se decidió hacer un ensayo para conocer el comportamiento de los hongos micorrícicos en este medio y en dos variaciones de él; $\frac{1}{2}$ MS., con la mitad de los macronutrientes y el $\frac{1}{2}$ N MS, con la mitad de nitrógeno del medio MS. En este ensayo, el medio MMN se empleo como control. La Tabla 6.3. muestra el área de crecimiento que presentaron estos cuatro medios semana a semana durante las 5 semanas que se mantuvieron en cultivo.

Tabla 6.3.: Medias \pm error estándar de las áreas de las colonias fúngicas de Pa L expresada en cm^2 , durante 5 semanas. Letras iguales dentro de cada columna indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

MEDIOS DE CULTIVO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
MMN	1,63 \pm 0,36 a	10,02 \pm 2,56 b	28,09 \pm 3,77 b	44,48 \pm 1,94 b	49,53 \pm 1,38 b
MS	5,35 \pm 0,82 a	37,95 \pm 3,41 a	59,16 \pm 0,28 a	59,16 \pm 0,28 a	59,44 \pm 0 a
½ MS	20,66 \pm 4,12 b	45,94 \pm 5,94 a	56,69 \pm 1,87 a	59,16 \pm 0,28 a	59,44 \pm 0 a
½ N MS	2,36 \pm 0,68 a	17,30 \pm 4,48 b	43,75 \pm 3,32 c	59,17 \pm 0,27 a	59,44 \pm 0 a

A partir de estos datos se realizaron las curvas de crecimiento del Pa L en cada uno de los medios para ver la evolución del crecimiento y poder calcular la regresión, la pendiente de la recta y la velocidad de crecimiento semanal (Fig.6.4.).

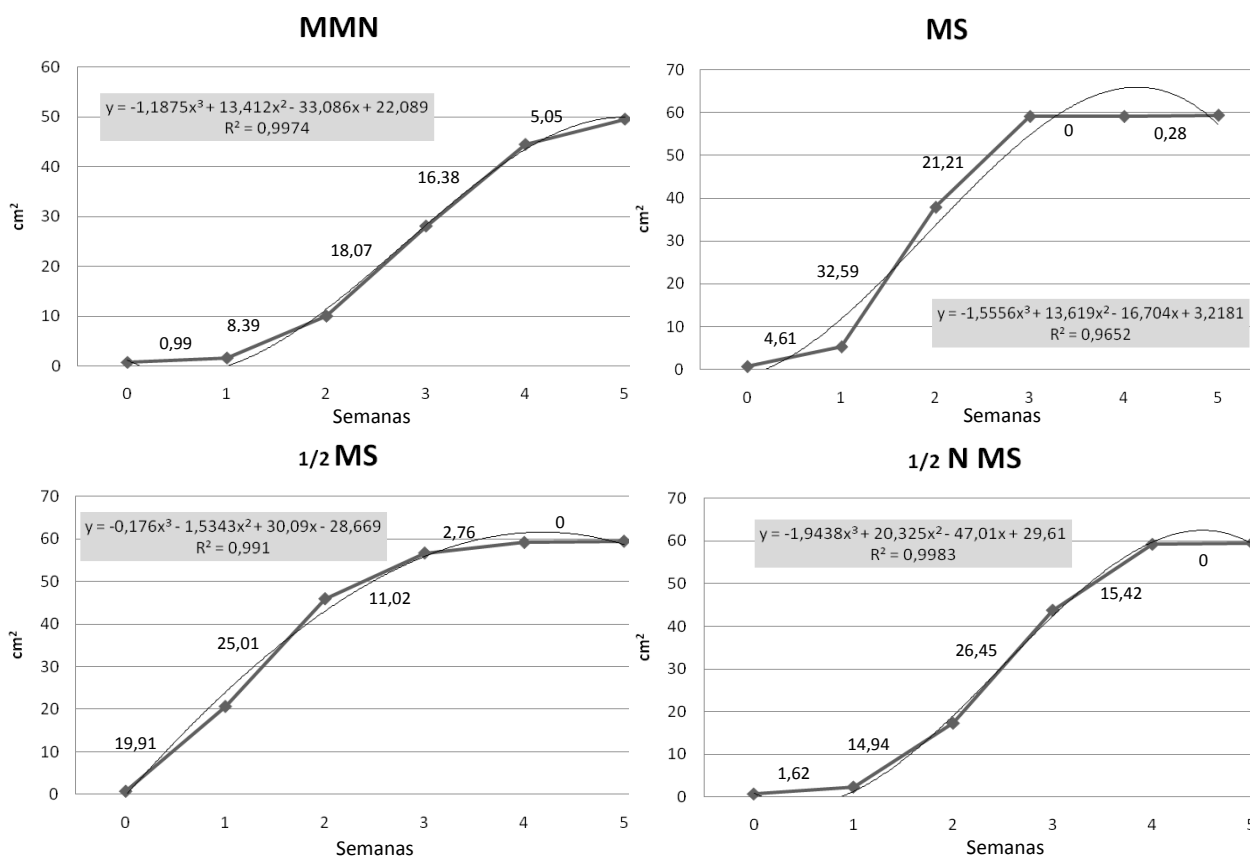


Fig.6.4.: Curvas de crecimiento de las colonias de *P. amoniavirescens* (Pa L). En ordenadas se representa el área de la colonia, expresada en cm^2 , y en abscisas las semanas de cultivo. Los valores numéricos presentes en cada intervalo semanal indican la velocidad media de crecimiento expresado en $\text{cm}^2/\text{semana}$.

Tras las 5 semanas de crecimiento se cuantificó la biomasa generada por el hongo en estos 4 medios de cultivo. El resultado se puede observar en la Fig.6.5.

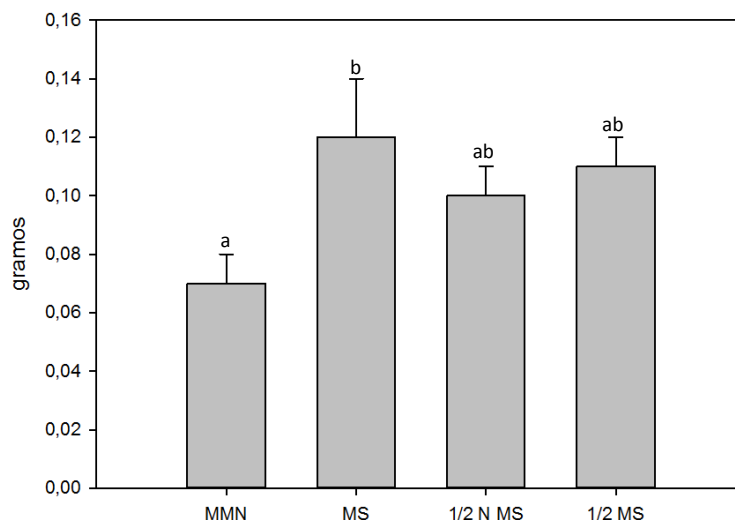


Fig.6.5.: Medias \pm error estándar de la biomasa generada por las colonias fúngicas de *P. amoniavirescens* (Pa L) expresada en gramos, tras 5 semanas de crecimiento en los cuatro medios d. Letras iguales indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

Durante el transcurso de este ensayo se observó que en los 4 medios de cultivo aparecían entre la segunda y la cuarta semana unas estructuras de resistencia denominadas esclerocios (tanto maduros como inmaduros)(Fig.6.6.).



Fig.6.6.: Fotografías de un cultivo de *P. amoniavirescens* (Pa L) en medio MMN en la quinta semana con numerosos esclerocios maduros en su superficie.

6.3.3. Variación del pH en diferentes medios causado por el crecimiento de *P. ammonivirescens* (Pa L)

Los resultados obtenidos de la variación de pH en los medios de cultivo MMN, MS y 1/2 MS, se muestran en la Tabla 6.4.:

Tabla 6.4.: Medias \pm error estándar del pH de las colonias de *P. ammoniavirescens* (Pa L) al alcanzar los 5 cm de diámetro en diferentes medios. Letras iguales dentro de cada fila indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$.

pH	MMN	MS	½ MS
	CONTROLES		
pH inicial	5,6		
pH del medio autoclavado y solidificado	5,39 \pm 0,06	5,55 \pm 0,02	5,59 \pm 0,02
pH del medio tras 5 semanas	5,44 \pm 0,07	5,51 \pm 0,1	5,49 \pm 0,08
CRECIMIENTO			
Interior del micelio	4,11 \pm 0,11 a	4,30 \pm 0,13 a	4,66 \pm 0,12 b
Borde del micelio	4,16 \pm 0,12 a	4,12 \pm 0,18 a	4,69 \pm 0,15 b
Exterior	3,96 \pm 0,11 a	4,03 \pm 0,17 a	4,66 \pm 0,12 b

En ningún caso existen diferencias significativas entre las medidas control dentro de un mismo medio ni entre los diferentes medios, existiendo en todos los casos una bajada significativa del pH causada por el crecimiento del hongo en los 3 medios con respecto a el pH de las placas control a un nivel $P=0,001$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

6.3.4. Crecimiento de los hongos de Nitrastur en medio MS

Debido a los buenos resultados obtenidos en el crecimiento de Pa L con el medio MS, se realizó otro ensayo de cultivo en este medio con el objetivo de incrementar el crecimiento de los hongos *A. muscaria*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* (Pa N), *S. citrinum* y *T. fulvum*. Al igual que en el ensayo anterior, el MMN se empleó como medio de cultivo de referencia.

Para el caso de *A. muscaria* y *L. pubescens* no se obtuvieron ningún crecimiento a parte del primer aislamiento ni en MS ni en MMN. En *L. scabrum* el crecimiento obtenido es similar en ambos medios (Fig.6.7.). Con un crecimiento lento, al final esta especie consigue crecer casi por toda la placa. Ambos crecimientos se diferencian en la coloración del medio en el caso del MMN cambia hacia una totalidad amarillenta mientras que el medio MS permanece traslúcido, y en la morfología del micelio siendo más aéreo y algodónoso en el caso del medio MMN.



Fig.6.7.: Fotografías de *L. scabrum* creciendo en el medio MMN y en MS a los 2 meses de su inoculación.

El aislamiento de *P. ammoniavirescens* (Pa N), mostró las mismas características y comportamiento que el aislamiento de Pa L, presentando un excelente crecimiento en MS (Fig.6.8.), superior al presentado en MMN. Cabe destacar el incremento en la producción de esclerocios por parte de este aislamiento.

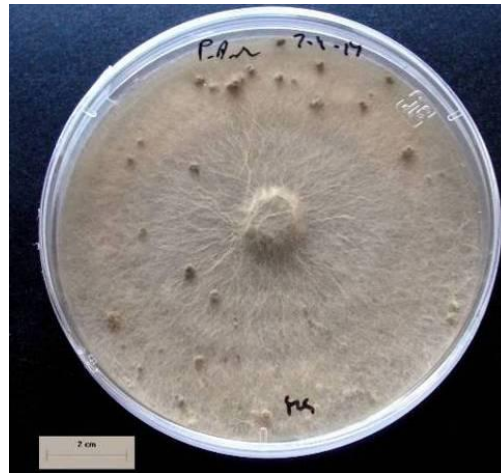


Fig.6.8.: Fotografía de *P. ammoniavirescens* (Pa N) creciendo en el medio MS al mes de la inoculación. Se observa la abundancia de esclerocios en la superficie.

De igual manera se obtuvieron excelentes resultados en el caso de *S. citrinum*, especie que crece activamente en el medio MS (Fig.6.9.) incrementado su velocidad de crecimiento, suponiendo una mejora en su cultivo con respecto a la utilización del medio MMN.



Fig.6.9.: Fotografía de *S. citrinum* creciendo en el medio MS al mes de la inoculación.

Por último para *T. fulvum* se logra un mayor crecimiento en el medio MS que en MMN (Fig.6.10.). Se observó que las características morfológicas de esta especie cambiaron, pasando a presentar un micelio blanco y mas algodonoso en MS. Adicionalmente se detectaron pequeños esclerocios en el cultivo en MS.



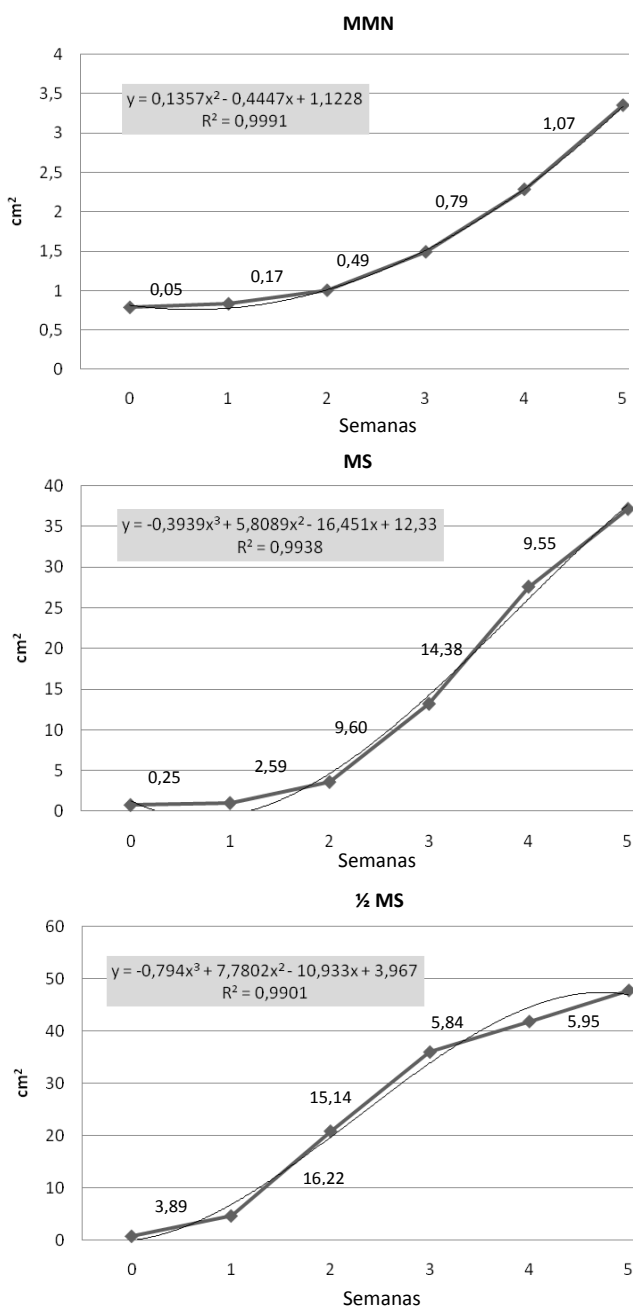
Fig.6.10.: Fotografías de *T. fulvum* creciendo en el medio MMN y en MS a los 2 meses de su inoculación. La flecha indica la presencia de un esclerocio.

6.3.5. Efecto del medio de cultivo en la producción de *P. cuprinus*

La Tabla 6.4. muestra el área de crecimiento de *P. cuprinus* en los medios MMN, MS Y ½ MS, durante las 5 semanas que se mantuvieron en cultivo.

Tabla 6.4.: Medias ± error estándar de las áreas de las colonias fúngicas de *P. cuprinus* expresada en cm², durante 5 semanas. Letras iguales dentro de cada columna indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel P=0,05. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

MEDIOS DE CULTIVO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
MMN	0,83±0,03 a	1±0,10 a	1,49±0,20 a	2,28±0,30 a	3,35±0,45 a
MS	1,03±0,07 a	3,62±0,79 a	13,22±3,35 b	27,60±5,64 b	37,15±6,12 b
½ MS	4,67±0,36 b	20,89±1,48 b	36,02±2,40 c	41,87±2,07 c	47,82±2,26 b



A partir de estos datos se realizaron las curvas de crecimiento del *P. cuprinus* en cada uno de los medios para ver la evolución del crecimiento y poder calcular la regresión, la pendiente de la recta y la velocidad de crecimiento semanal (Fig.6.11.).

Cabe señalar que tanto en el medio MMN como en el MS no todas las placas mostraron crecimiento, siendo por tanto el medio ½ MS el que mostró un comportamiento más regular.

Fig.6.11.: Curvas de crecimiento de las medias de las áreas de las colonias fúngicas de *P. cuprinus* expresada en cm², durante 5 semanas. Los valores numéricos presentes en la curva indican la velocidad media de crecimiento expresado en cm²/semana, en cada intervalo semanal.

Tras las 5 semanas de crecimiento se cuantificó la biomasa generada por el hongo en estos 4 medios de cultivo. El resultado se puede observar en la figura 6.12..

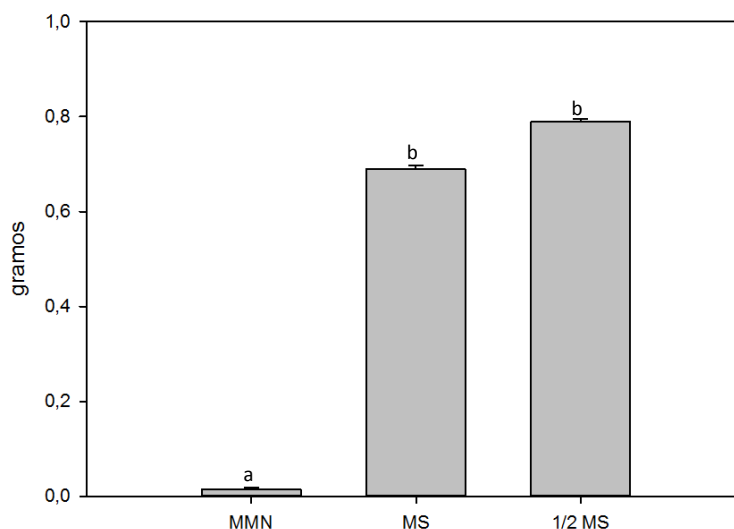


Fig.6.12.: Medias \pm error estándar de la biomasa generada por las colonias fúngicas de *P. cuprinus* expresada en gramos, tras 5 semanas de crecimiento en los tres medios. Letras iguales indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

6.3.6. Síntesis de micorrizas *in vitro*

La Tabla 6.5. muestra los resultados obtenidos entre las diferentes combinaciones utilizadas de hongo, planta y sistemas de micorrización:

Tabla 6.5.: Resultados de la síntesis de micorrizas obtenidos. **B** indica *B. celtiberica*, **S** *S. atrocinerea* y **P** *Populus nigra*. **M** indica micorrizas, **n M** no hay presencia de micorrizas y **PC** parcialmente compatible.

Especie	Sistema							
	Frasco 250 ml			Tubo Pyrex			Frasco 700 ml	
	B	S	P	B	S	P	B	S
<i>A. muscaria</i>	PC	n M	n M	----	----	----	----	----
<i>L. scabrum</i>	M	n M	n M	----	----	----	----	----
<i>P. ammoniavirescens</i>	M	n M	n M	M	M	n M	----	----
<i>P. cuprinus</i>	n M	n M	n M	n M	n M	n M	M	n M
<i>S. citrinum</i>	n M	----	----	----	----	----	M	----
<i>T. fulvum</i>	M	n M	n M	----	----	----	----	----

Aunque la micorrización de abedul con *P. ammoniaviresces* (Pa L) en tarro fue del 92%, este valor puede ser mayor, ya que el 8% restante se debió a problemas de contaminación o al no crecimiento del hongo.



Fig.6.13.: Cultivo *in vitro* de *B. celtiberica* micorrizada por *P. ammoniavirescens* (Pa L) en cámara de cultivo

6.3.7. Descripción Macro y Microscópica de las micorrizas

Amanita muscaria

Al cabo de un mes de la inoculación del abedul por *A. muscaria* se observa una elevada densidad de micelio alrededor de algunas raíces (Fig.6.14.A). En estas zonas existen estructuras no ramificadas de $2,96 \pm 0,44$ mm de longitud y $0,35 \pm 0,03$ mm de anchura; derechas o ligeramente dobladas; de color blanco mate y con una textura lanosa u algodonosa (Fig.6.14.B). Destaca la elevada densidad de micelio alrededor de las raíces.



Fig.6.14.: A) Aspecto macroscópico de las estructuras generadas por *A. muscaria* en *B. celtiberica* en los tarros *in vitro*, B) Detalle de la punta.

Microscópicamente se observa un manto muy grueso de $66,44 \pm 2,90$ μm (Fig.6.15.), sin hifas emergentes y en el que tan solo se diferencia una única capa cuya organización está entre prosénquima en estructura de red y un pseudoparénquima en estructura de red. En ningún caso se observa red de Hartig, ni tampoco necrosis en las células vegetales. Se recogieron muestras a los 40 y 60 días, y se corroboró estas observaciones. Aunque estas estructuras tienen aspecto de micorriza, no podemos confirmar la micorrización del abedul por *A. muscaria* en estas condiciones *in vitro*. Es por ello que se considera que no es una ectomicorriza y que en estas condiciones de cultivo ambos organismos son parcialmente compatibles.

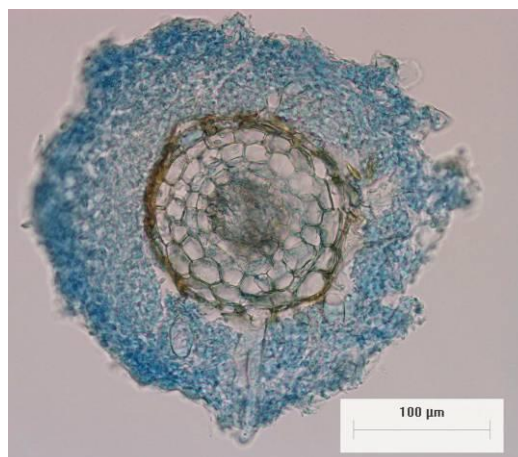


Fig.6.15.: Corte transversal de raíz de *B. celtiberica* con *A. muscaria* rodeandola, teñida con azul de algodón.

Leccinum scabrum

Las ectomicorrizas de esta especie aparecen a los 45 días de co-cultivo con *B. celtiberica* (Fig.6.16.). Ectomicorrizas no ramificadas o raramente dicotómicas, longitud de la

punta $2,82 \pm 0,39$ mm, ancho de la punta $0,23 \pm 0,01$ mm, ancho de la base de la punta $0,22 \pm 0,02$ mm. Puntas derechas, de color blanco mate, presentan una textura lanosa. Destaca la elevada cantidad de cordones miceliares y su distribución homogénea por todo el sistema radicular de la planta.



Fig.6.16.: Aspecto macroscópico de las micorrizas generadas por *L. scabrum* en *B. celtiberica* en los tarros *in vitro*.

Con elevadas hifas emergentes tortuosas y con ornamentación verrugosa, con una longitud media de $60,10 \pm 11,10$ μm y con fíbulas escasas. El manto presenta un espesor de $46,69 \pm 3,72$ μm , estructurado en 2 capas: una primera capa de prosénquima en estructura de red de unos $28,40 \pm 2,23$ μm y una segunda de pseudoparénquima en estructura de red de $19,32 \pm 1,19$ μm . Presentan una red de Hartig (Fig.6.17.) que se extiende por las células de la epidermis y la primera y segunda capa de células corticales.

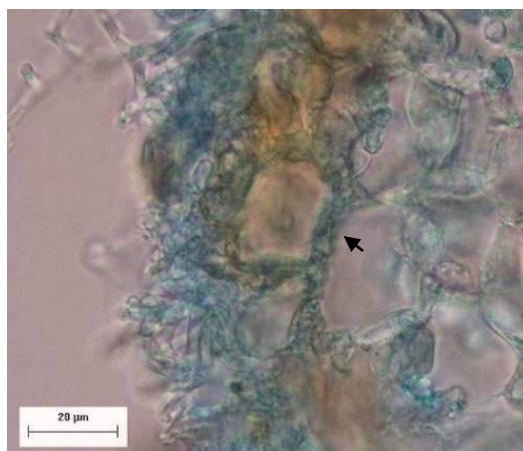


Fig.6.17.: Corte transversal de raíz de *B. celtiberica* micorrizada por *L. scabrum* teñido con azul de algodón. La flecha señala la Red de Hartig.

***Paxillus ammonivirescens* (Pa L)**

Para esta especie, tal como muestran los datos de la Tabla 6.5. se consiguió la síntesis de ectomicorrizas con *B. celtiberica* y *S. atrocinerea* entre de los 15 y los 30 días. En las inoculaciones de *P. nigra*, *P. ammonivirescens* solo se desarrollo como un saprófito en el medio de cultivo. Las características de las micorrizas formadas por *P. ammonivirescens* en *B. celtiberica* y *S. atrocinerea* son las siguientes:

En *B. celtiberica*, las ectomicorrizas no ramificadas en juveniles, pasan a monopodiales-pinnadas tendiendo a irregulares (Fig.6.18.A.). Longitud del sistema $7,87 \pm 0,50$ mm, longitud de la punta $1,56 \pm 0,12$ mm, ancho de la punta $0,26 \pm 0,01$ mm, ancho del eje mayor $0,30 \pm$

0,02 mm, ancho de la base de la punta $0,27 \pm 0,01$ mm. Puntas derechas pasando a ser tortuosas (Fig.6.18.B). Inicialmente de color blanco, llegan al marrón con un lustre mate. Presentan una textura aterciopelada raramente algodonosas con cordones miceliares y en ocasiones esclerocios adheridos a la micorriza.



Fig.6.18.: A) Aspecto macroscópico de las micorrizas generadas por *P. ammoniavirescens* con *B. celtiberica*, B) Detalle de la punta.

Las micorrizas de abedul con *P. ammoniavirescens* tienen escasas hifas emergentes; las existentes son tortuosas sin ornamentación, con una longitud media de $65,48 \pm 12,56$ μm . El manto, muy compacto, presenta un espesor de $69,28 \pm 4,62$ μm (Fig.6.19.A), estructurado en 2 capas: una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red de unos $42,69 \pm 3,46$ μm y una segunda de pseudoparénquima irregular de $26,76 \pm 2,17$ μm . Presentan una muy desarrollada red de Hartig (Fig.6.19.B) que se extiende hasta la tercera o cuarta capa de células corticales. Tras las células epidérmicas se observa una banda de fenoles.

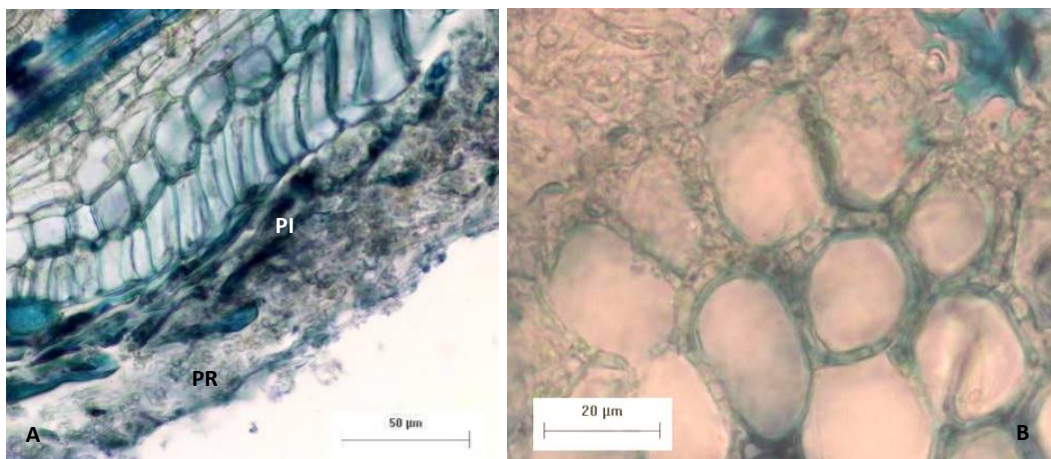


Fig.6.19.: A) Corte longitudinal teñido con azul de toluidina. PR indica pseudoparénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular, B) Corte transversal teñido con azul de toluidina que muestra la red de Hartig.

Las micorrizas juveniles de *S. atrocinerea* con *P. ammoniavirescens* tienen una estructura no ramificadas que pasa a monopodial-pinnada o monopodial-piramidal (Fig.6.20.). De color blanco, inicialmente, llegando al parduzco con un lustre mate y textura aterciopelada. Las medidas de las micorrizas son: longitud del sistema $4,72 \pm 0,47$ mm, longitud de la punta $2,04 \pm 0,15$ mm, ancho de la punta $0,26 \pm 0,01$ mm, ancho del eje mayor $0,35 \pm 0,02$ mm, ancho de la base de la punta $0,31 \pm 0,01$ mm. Puntas dobladas o inclinadas. Presentan cordones miceliares y numerosos esclerocios adheridos a la micorriza.



Fig.6.20.: Aspecto macroscópico de las micorrizas generadas por *P. ammoniavirescens* con *S. atrocinnerea*.

Las micorrizas de sauce con *P. ammoniavirescens* tienen escasas hifas emergentes, las existentes son tortuosas sin ornamentación, con una longitud media de $37,62 \pm 3,21 \mu\text{m}$. El manto presenta un espesor de $49,22 \pm 3,58 \mu\text{m}$, estructurado en 2 capas (Fig.6.21.A): una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red de unos $31,82 \pm 2,65 \mu\text{m}$ y una segunda de pseudoparénquima irregular de $17,46 \pm 1,35 \mu\text{m}$. Presentan una muy desarrollada red de Hartig que se extiende hasta la tercera o cuarta capa de células corticales (Fig.6.21.B). Tras las células epidérmicas no se observan fenoles.

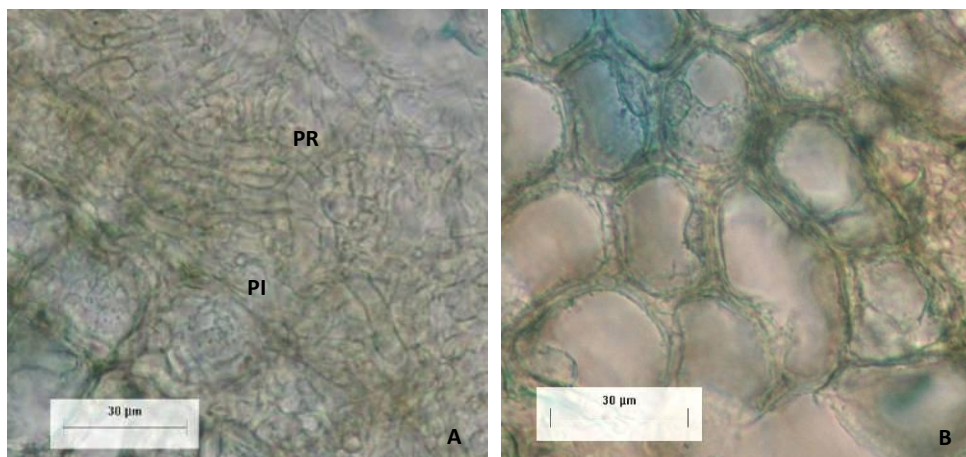


Fig.6.21.: A) Corte longitudinal teñido con azul de toluidina. PR indica pseudoparénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular, B) Corte transversal teñido con azul de toluidina que muestra la red de Hartig.

En *P. nigra* se observa un micelio creciendo alrededor de las raíces que puede estar implicado en la necrosis de estas. Al realizar cortes histológicos, se aprecia que el micelio constituye una especie de manto sin una organización clara y células de la raíz necrosadas; todo ello acompañado por una coloración marrón rojiza atribuible a la presencia de fenoles (Fig.6.22.).

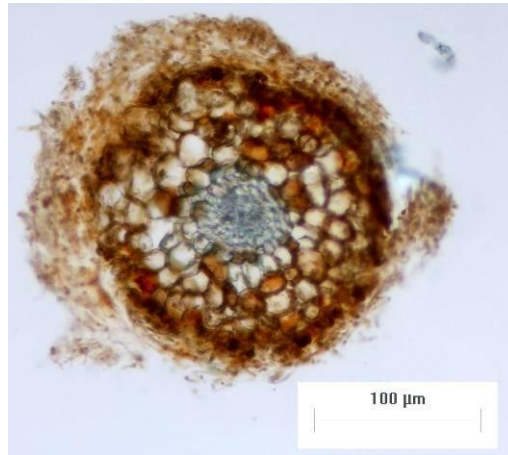


Fig.6.22.: Corte transversal de una raíz de *P. nigra* rodeada con *P. ammoniavirescens*.

P. cuprinus

Para este hongo, las micorrizas de abedul comienzan a observarse al cabo de 15 días de co-cultivo. Son muy abundantes y aparecen por todo el sistema radicular. Las ectomicorrizas juveniles no son ramificadas pero posteriormente pasan a monopodiales-pinnadas o monopodiales-piramidales (Fig.6.23.A). Las medidas de las micorrizas son: Longitud del sistema $4,63 \pm 0,44$ mm, longitud de la punta $2,23 \pm 0,21$ mm, ancho de la punta $0,32 \pm 0,06$ mm, ancho del eje mayor $0,38 \pm 0,05$ mm, ancho de la base de la punta $0,35 \pm 0,02$ mm. Tienen puntas derechas y un color blanco parduzco, mate, con una textura entre aterciopelada y lanosa (Fig.6.23.B).

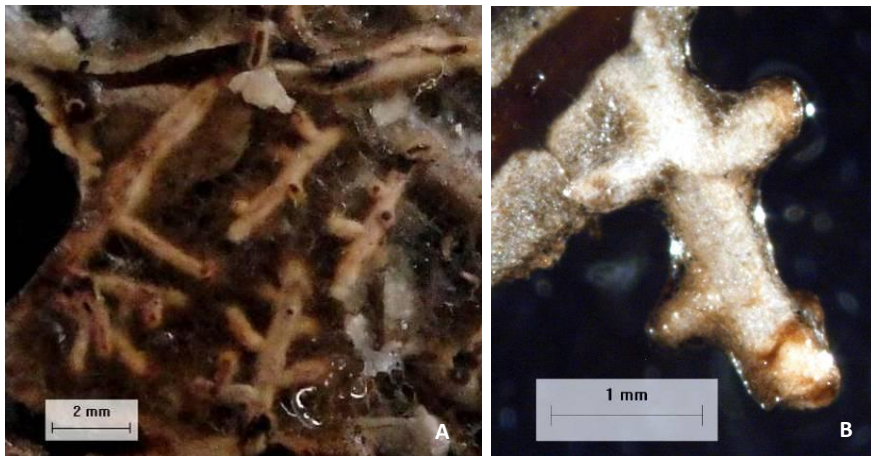


Fig.6.23.: A) Aspecto macroscópico de las micorrizas de *B. celtiberica* generadas por *P. cuprinus*, B) Detalle de la punta.

Las micorrizas de abedul con *P. cuprinus* tienen escasas hifas emergentes, las existentes son tortuosas sin ornamentación, con una longitud media de $34,90 \pm 6,73$ μm , presentan abundantes fíbulas. El manto presenta un espesor de $42,35 \pm 4,22$ μm , estructurado en 2 capas (Fig.6.24.A): una primera de pseudoparénquima en estructura de red de unos $23,56 \pm 2,59$ μm y una segunda de pseudoparénquima irregular de $18,85 \pm 2,75$ μm . Presentan una red de Hartig que se extiende entre la primera y segunda capa de células corticales (Fig.6.24.B).

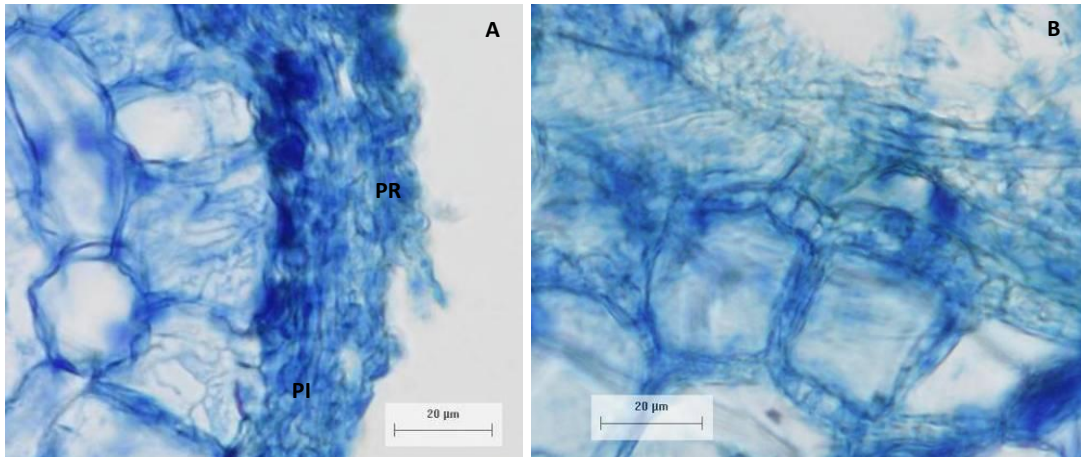


Fig.6.24: **A)** Corte transversal teñido con azul algodón. PR indica pseudoparénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular, **B)** Corte longitud teñido con azul de algodón que muestra la red de Hartig.

S. citrinum

Las micorrizas obtenidas entre esta especie y *B. celtiberica* presentan características macro (Fig.6.25.A) y microscópicas (Fig.6.25.B) similares a las descritas en el Capítulo 4 para las micorrizas encontradas en campo de ambas especies. Sería necesario un estudio más exhaustivo para determinar si la ultraestructura del manto es igual en ambos casos.

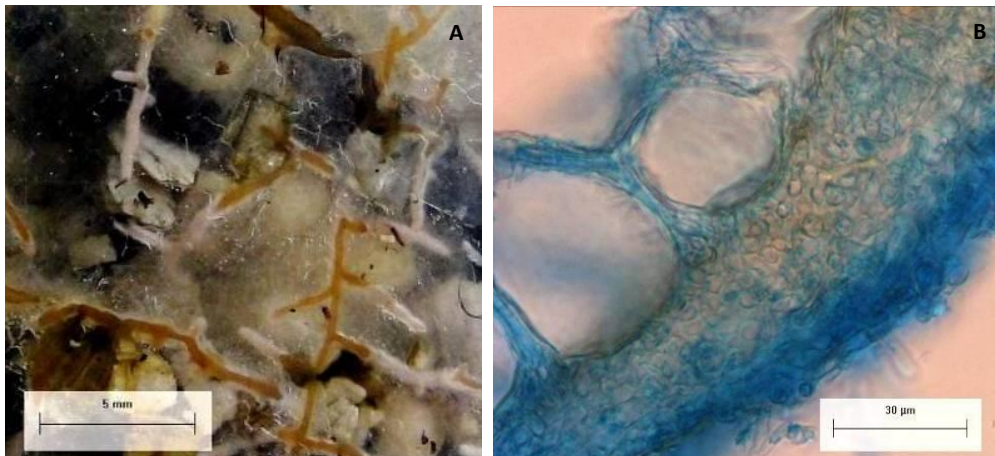


Fig.6.25: **A)** Aspecto macroscópico que presentan las ectomicorrizas de esta especie *in vitro*, **B)** Corte transversal teñido con azul de algodón que muestra el manto. La flecha indica la red de Hartig.

T. fulvum

Las ectomicorrizas de *T. fulvum* aparecen en escaso número al cabo de los 2 meses de co-cultivo con *B. celtiberica*. Son no ramificadas con una longitud de $3,46 \pm 0,88$ mm, longitud de la punta $1,59 \pm 0,50$ mm, ancho de la punta $0,21 \pm 0,04$ mm, ancho del eje mayor $0,24 \pm 0,05$ mm, ancho de la base de la punta $0,22 \pm 0,03$ mm. Puntas derechas tendiendo a dobladas o inclinadas. De color blanco anaranjado, mate, presentan una textura entre aterciopelada y lanosa. Destaca la presencia de numerosos cordones miceliarios blancos (Fig.6.26.). Desafortunadamente en este caso no se consiguió realizar histología de estas estructuras.



Fig. 6.26.: Aspecto macroscópico de las ectomicorrizas de *T. fulvum in vitro*.

6.3.8. Esclerocios de *P. ammoniavirescens*

Dentro del desarrollo de un esclerocio de Pa L definimos 2 estadios: Esclerocios inmaduros y esclerocios maduros. Los esclerocios inmaduros (Fig.6.27.A) cuyo tamaño oscila entre $0,89 \pm 0,04$ mm de largo y los $0,57 \pm 0,02$ de ancho, están continuamente desarrollándose sobre el micelio. Frecuentemente se forman muchos juntos, pudiéndose fusionar entre ellos. La mayoría de estos esclerocios no llega a madurar pero, entre 6 y 8 días de su aparición, algunos continúan su desarrollo alcanzando la madurez con un tamaño de $1,29 \pm 0,05$ mm de largo y $1,20 \pm 0,05$ mm de ancho (Fig.6.27.B). Durante esta etapa final del desarrollo, aparecen un exudado negro que puede cubrirlo completamente.

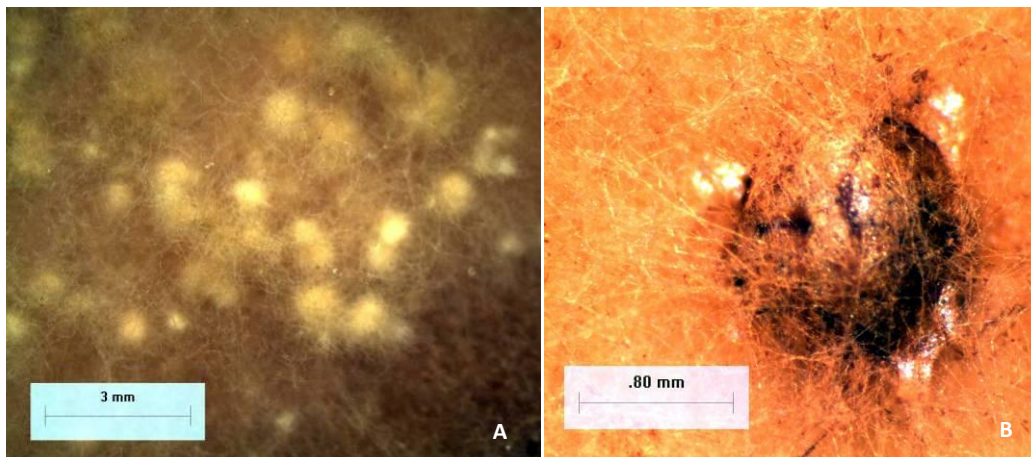


Fig. 6.2.: A) Esclerocios inmaduros de *P. ammoniavirescens*, B) Esclerocios maduros de *P. ammoniavirescens*.

6.3.8.1. Estructura del esclerocio

Mediante la tinción con azul de algodón se han podido observar las diferencias entre esclerocios inmaduros y maduros. En el caso de los inmaduros se observa un agrupamiento de hifas en la que se comienza a vislumbrar la formación de un pseudoparénquima en la parte central del esclerocio (Fig.6.28.).

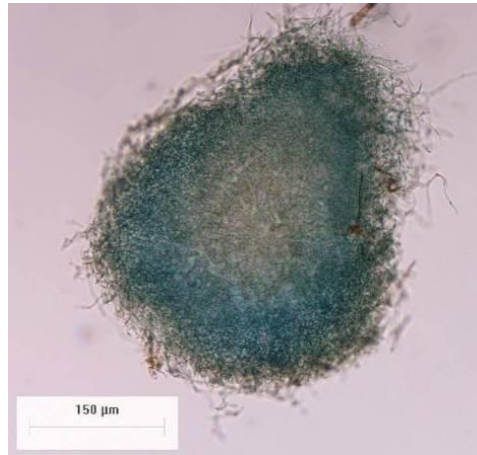


Fig.6.28.: Esclerocio inmaduro de *P. ammoniavirecens* teñido con azul de algodón.

Sin embargo en los esclerocios maduros se observan dos capas claramente diferenciadas. Una corteza externa claramente definida de $25,99 \pm 0,61 \mu\text{m}$ de ancho, formada por 6 ó 7 capas de hifas compactas que forman un pseudoparénquima en estructura de red, fuertemente pigmentadas, sin espacios intercelulares obvios y con células elongadas, en la que no se observan ningún tipo de inclusión (Fig.6.29.A). Tras esta capa se observa una medula, variable en tamaño según las dimensiones del esclerocio, de pseudoparenquima irregular, con células isodiamétricas y compactas, con numerosas inclusiones variables en tamaño y forma, encontrándose algunas completamente vacías e incrementando su tamaño desde la corteza hasta el centro de la medula (Fig.6.29.B). Adicionalmente, dependiendo del estado de madurez, en el centro de la medula se pueden observar hifas fuertemente pigmentadas y, en la mayoría de los casos, degradadas que vierten su contenido en el interior del esclerocio. Las fases previas o posteriores a la degradación de estas células podría corresponder con los estados previos o posteriores a la presencia de los exudados negros sobre los esclerocios.

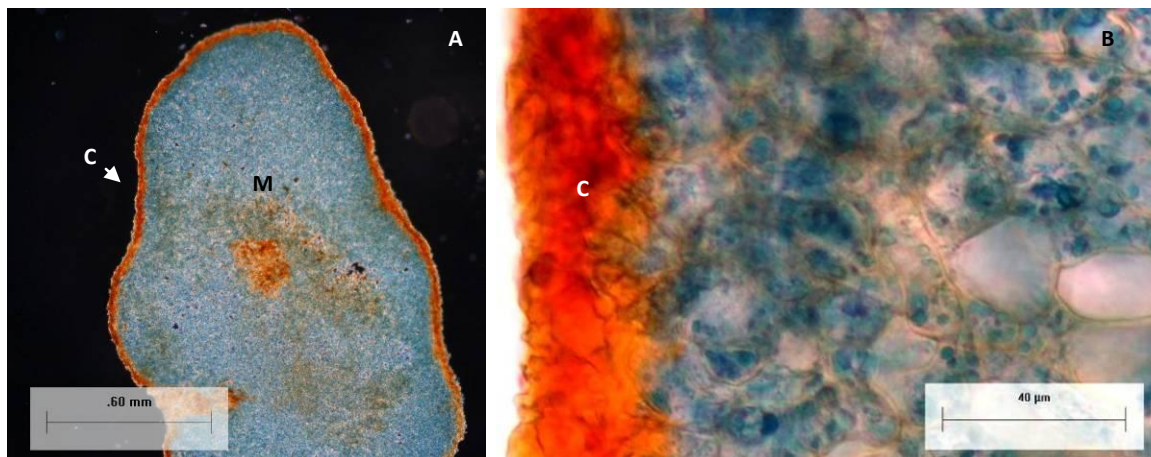


Fig.6.29.:A) Esclerocio maduro teñido con azul de algodón. C indica corteza, M indica medula, B) Detalle del pseudoparenquima irregular que constituye la medula. C indica corteza, M indica medula.

Mediante la utilización del colorante azul de toluidina, se hifas observa la misma situación que en azul de algodón para los esclerocios inmaduros, agrupadas contituyendo un pseudoparénquima en el centro de la estructura. Sin embargo para el caso de los esclerocios maduros se consigue la diferenciación de 4 capas medulares (Fig.6.30.A) además de la corteza previamente observada. Inmediatamente después de la corteza se encontraría una capa de 2-3 capas de células constituida por pseudoparénquima irregular entrelazado, en el que las hifas se conectan entre sí como en un puzle, en las que se comienzan a distinguir acúmulos de

sustancias (Fig.6.30.B). Posteriormente se encontraría una capa de $0,26\pm 0,01$ mm de ancho de pseudoparenquima irregular en las que se encuentran hifas metacromáticas adoptando una coloración roja, causada por la presencia de polisacáridos ácidos en las que se observan ya claramente definidos los acúmulos de reserva. Posteriormente se vuelve a encontrar pseudoparénquima irregular entrelazado de entre 3-4 capas de células en las que comienzan a disminuir los acúmulos de reserva, para posteriormente encontrar el interior de médula degradado o con hifas de pseudoparénquima irregular entrelazado sin presentar inclusiones. Tanto las células mas internas de la medula con los intersticios de hifas inmediatamente anteriores presentan una coloración azul verdosa, causada por la presencia de polifenoles, saliendo desde las células internas al exterior del esclerocio.

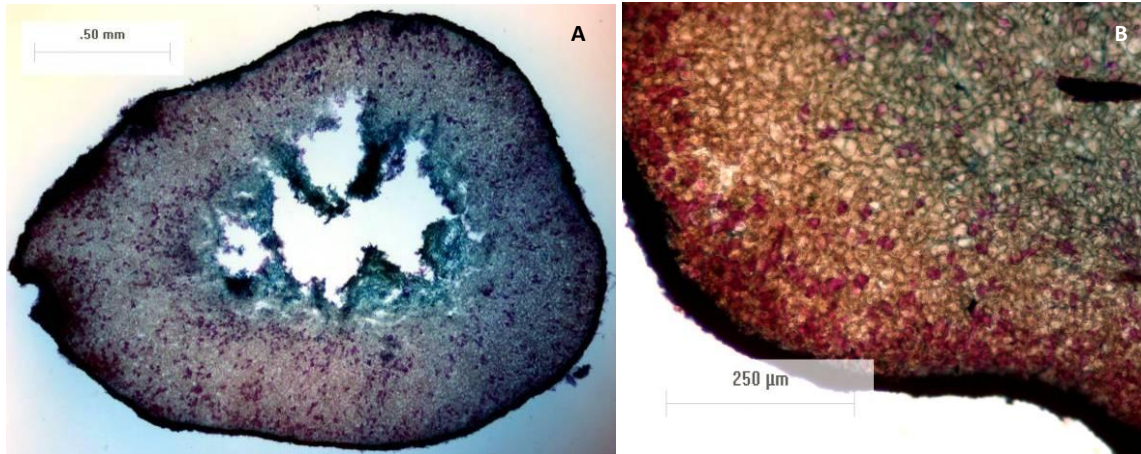


Fig.6.30.: A) Esclerocio maduro teñido con azul de toluidina mostrando todas sus capas, B) Detalle de las diferentes capas observadas en esclerocio.

Mediante la tinción de fucsina ácida se observa que la mayoría de las sustancias de reserva presentes en la médula podrían ser acúmulos proteicos (Fig.6.31.B), estableciéndose un gradiente de degradación desde el interior del esclerocio hasta la corteza. (Fig.6.31.A). Mediante la tinción de azul de alcian solo detectamos la presencia de mucopolisacáridos en las células internas de la médula en especial en las zonas degradadas (Fig.6.31.C). Por último mediante la tinción Sudan Black B detectamos la presencia de pequeños gránulos de lípidos en la periferia de las células más cercanas a la corteza (Fig.6.31.D).

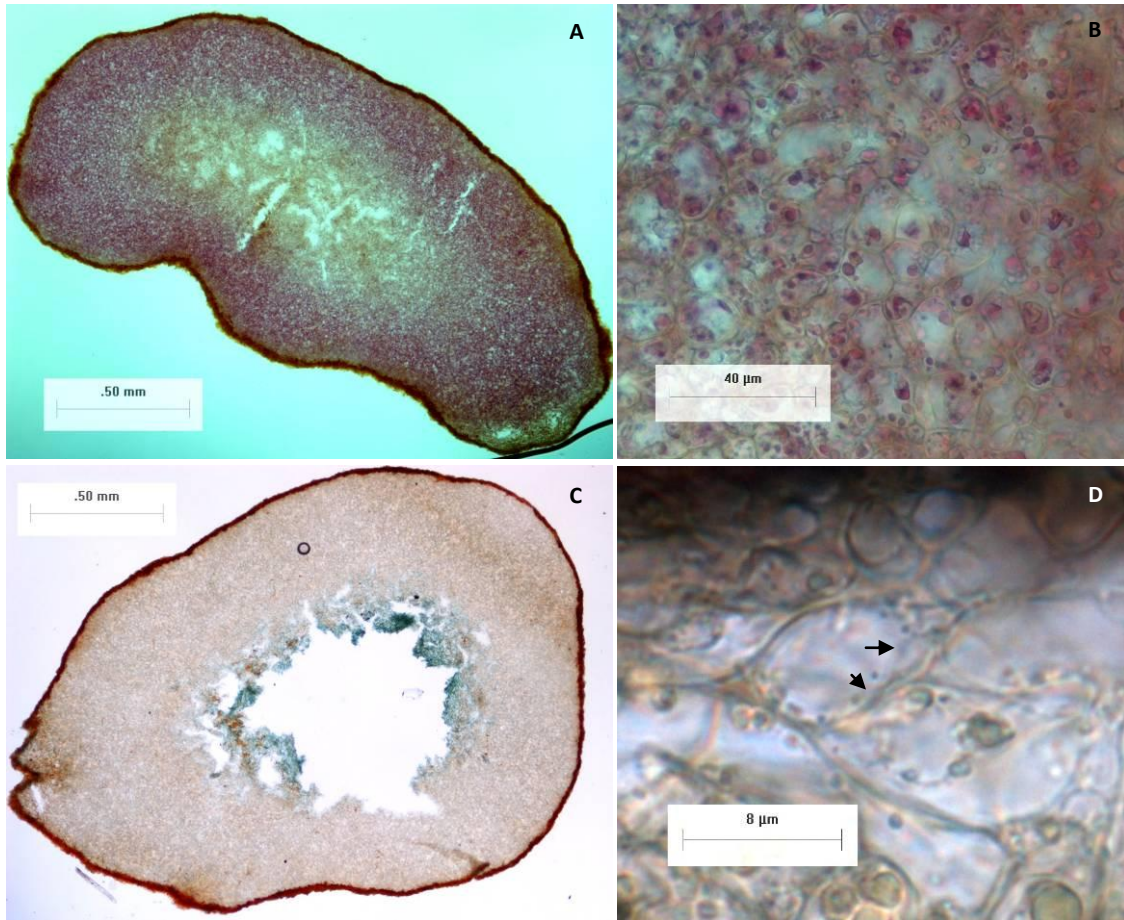


Fig.6.31.: A) Esclerocio maduro teñido con fucsina acida mostrando el gradiente de acumulos proteicos del interior al exterior de la medula, B) Detalle los acumulos proteicos, C) Esclerocio maduro teñido con azul de alcian mostrando la presencia de mucopolisacaridos en las células del interior de la médula, D) La flecha indica los pequeños acumulos periféricos de lípidos teñidos mediante Sudan Black B.

6.3.8.2. Esclerocios como fuente de inóculo

Una vez determinada la estructura interna del esclerocio comprobamos su capacidad como inóculo. De las 15 placas inoculadas con esclerocios, 13 de ellas presentaron crecimiento al cabo de los 2 meses, presentando las 15 placas control inoculadas con micelio los mismos resultados, no observándose por tanto diferencias entre la utilización de ambos tipo de inóculo ni en número de placas crecidas ni en la cantidad de micelio generado (Fig.6.32.).

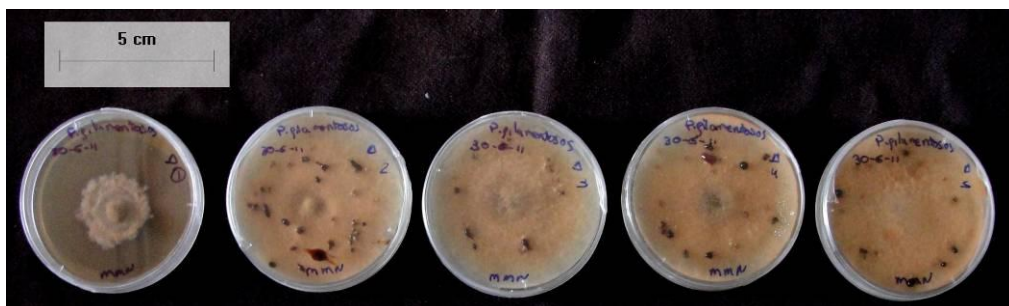


Fig.6.32.: Micelio generado a partir de esclerocios maduros como inóculo inicial.

Al igual que el inóculo miceliar, los esclerocios también fueron capaces de servir como inóculo fungico para micorrizar *B. celtiberica*. Al cabo de 1 mes de inocular las plantas con los esclerocios se comprobó que el 100% de los abedules inoculados formaron micorrizas.

6.3.8.3. Efecto del medio de cultivo y la temperatura en la producción de esclerocios

La Tabla 6.6. muestra el número de placas que presentan esclerocios maduros y el número total de esclerocios maduros por tratamiento del primer ensayo después de cultivar durante 12 semanas *P. ammoniavirescens* de cultivo en los medios MMN, MMN N-,MMN N+ a las temperaturas de 8 °,10° y 23 °C, y el número de placas que presentan esclerocios maduros del segundo ensayo en los medios MS y ½ MS a 8 ° y 23 °C.

Tabla 6.6.: Indica el número de placas del total de 10 que había en cada tratamiento (Nº Placas) que presentan esclerocios, así como el número total de estas estructuras (Nº Esclerocios).

Medio	Nº Placas			Nº Esclerocios		
	8 °C	10 °C	23 °C	8 °C	10 °C	23 °C
MMN N-	4	3	3	38	7	3
MMN	1	0	2	1	0	19
MMN N+	2	0	2	20	0	22
MS	10	-	1	-	-	-
½ MS	10	-	4	-	-	-

Con estos datos podemos decir que en el primer ensayo, aunque no existan diferencias significativas (Z-test, $p=0,05$) en el número de placas en las que aparecen los esclerocios, si parece existir un incremento del número total de estructuras causada por la variación de N y por la bajada de temperatura a 8 °C. Los resultados del segundo ensayo muestran que la bajada de temperatura a 8 °C afecta significativamente (Z-test, $p=0,05$) al número de placas que producen de esclerocios independientemente de la utilización de los medios MS o ½ MS, siendo además superior a la tasa obtenida en el primer ensayo. En este último ensayo no se pudo cuantificar el número total de esclerocios porque los observados eran o bien maduros de tamaño muy pequeño o inmaduros. Por lo que optamos por dejar 2 semanas más todas las placas a 23 °C. Como resultado obtuvimos un crecimiento activo del micelio, y la aparición de esclerocios maduros 6/10 placas de ½ MS y 7/10 de MS (Fig.6.33.).

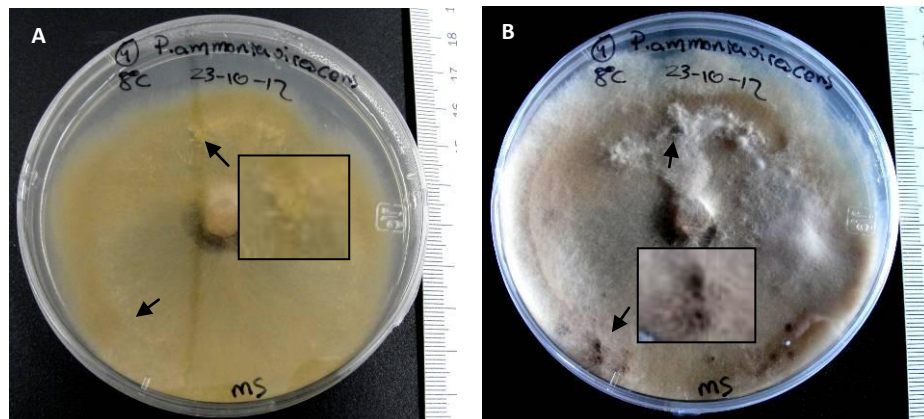


Fig.6.33.: A) Micelio tras 2 semanas a 8 °C, B) Misma placa tras 2 semanas a 23 °C. La flecha señala los esclerocios.

6.4. Discusión.

El éxito de la aplicación de hongos micorrízicos en programas de reforestación dependerá de una correcta selección de especies adaptadas a unas determinadas condiciones ambientales (ecotipos), así como de la facilidad de manejarlos y producirlos en grandes cantidades. En nuestro caso, estas especies deben presentar una alta tolerancia a los metales pesados para poder ser utilizadas en zonas contaminadas. Con estos criterios seleccionamos las especies *Amanita muscaria*, *Cortinarius alboviolaceus*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. sinapizans*, *Laccaria laccata*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *Paxillus ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *Scleroderma citrinum*, *Tricholoma cingulatum* y *T. fulvum*; todas ellas procedentes de Nitrastur de zonas altamente contaminadas para intentar su aislamiento y producción *in vitro*. De todas ellas conseguimos aislar y crecer las especies *A. muscaria*, *L. pubescens*, *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* (Pa N), *P. cuprinus*, *S. citrinum* y *T. fulvum*.

Adicionalmente disponíamos de un aislamiento de *P. ammoniavirescens* (Pa L) capaz de micorrizar a *Betula celtiberica* y que en trabajos previos *in vitro* (Fernández *et al.*, 2008) ha sido capaz de crecer y acumular Cd, por lo que tomamos a este aislamiento como modelo para iniciar los trabajos *in vitro*. Además esta especie resulta interesante ya que se tiene un escaso conocimiento de su cinética de crecimiento, ya que tan solo se ha estudiado su crecimiento en el medio MP (*malt extract peptone*) (Jargeat *et al.*, 2014).

Tradicionalmente el medio de cultivo más utilizado es el MMN, existiendo numerosas especies que presentan grandes problemas a la hora de ser cultivadas imposibilitando su posterior uso como inóculo. Estudios realizados por Molina y Palmer (1982), defienden que esto se puede producir por no utilizar un medio de cultivo adecuado que aporte sustancias esenciales que en condiciones naturales el hongo obtiene de su hospedante en la simbiosis. Esto se ha demostrado en *Cantharellus cibarius* al cultivarlo en un medio nutritivo complejo, como es el MFM (Danell, 1994). Es por ello que nos planteamos la utilización de cuatro medios de cultivo, MMN, MFM, BAF y MEPA, que difieren en su contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas para intentar optimizar el crecimiento de *P. ammoniavirescens* (Pa L).

Los resultados obtenidos, tal como muestra la figura 6.4., determinan que esta especie presenta un buen crecimiento, y sin diferencias significativas, en los medios BAF, MFM y MMN. Por el contrario en el medio MEPA el crecimiento es significativamente inferior. Las especies del género *Paxillus* se han descrito como organismos pioneros (Mason *et al.*, 1983; Gryta *et al.*, 1997) que tienen una alta capacidad competitiva con otros hongos para tomar nutrientes en suelos pobres con escasa materia orgánica. Esto podría explicar el comportamiento de *P. ammoniavirescens* en estos 4 medios. En los medios BAF, MFM y MMN, los elementos esenciales proceden principalmente de las sales minerales y la fuente de carbono es fácilmente asimilable de azúcares sencillos. Por el contrario, el medio MEPA tiene una composición totalmente orgánica que procede del extracto de malta y de la peptona.

A partir de estos resultados y profundizando en el trabajo de Danell (1994), decidimos probar el medio MS típicamente utilizado para el crecimiento *in vitro* de plantas, así como 2 modificaciones del mismo ($\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ N MS) variando su contenido en macronutrientes y N. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el medio MS y sus dos modificaciones suponen una mejora significativa en el crecimiento de *P. ammoniavirescens* (Pa L) en cuanto a su áreas de crecimiento, así como en el caso del MS en la biomasa generada con respecto a la utilización del MMN.

El estudio de la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos resulta difícil de caracterizar, especialmente en medio sólido. Erróneamente se ha tendido a interpretar su crecimiento de la misma manera que se haría con las bacterias y levaduras, sin embargo el crecimiento en estos hongos solo se realiza en la punta de las hifas y no en cada célula individual, por lo que no son aplicables ni las ecuaciones de crecimiento ni la terminología. French y Hebert (1982) estiman que cuando en un medio sólido se observa un avance del hongo constante y uniforme se puede decir que el hongo presenta un crecimiento indefinido o no estancable, y cuando este crecimiento no es uniforme y se detiene se denomina crecimiento definido o estancable, pudiendo variar un mismo hongo su ritmo de crecimiento cuando los factores ambientales no son propicios. Al analizar las curvas de crecimiento obtenidas se observa que tanto los medios MMN, MS como $\frac{1}{2}$ N MS presentan una fase de adaptación durante la primera semana, comenzando una aceleración del crecimiento en la segunda. Esta fase de adaptación no se observa en el medio $\frac{1}{2}$ MS comenzando a crecer desde la primera semana acelerando aún más su crecimiento en la segunda. Aún con este inicio del crecimiento es el medio MS el que adquiere una mayor velocidad de crecimiento llegando en la tercera semana a ocupar la práctica totalidad de la superficie de las placas, seguido de $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{2}$ N MS, siendo el medio MMN el que menor área y velocidad alcanza de todas las combinaciones probadas. Independientemente de este hecho, *P. ammoniavirescens* en medio sólido parece presentar un crecimiento definido ya que en ninguno de los 4 medios presenta una velocidad constante de crecimiento y se ve una desaceleración del crecimiento a partir de la tercera semana. Si calculamos el punto de inflexión mediante la derivación de las ecuaciones de la recta resultante, obtenemos de manera matemática el punto donde el crecimiento se ralentiza, siendo en el medio MMN a las 3,76 semanas, MS a las 2,91 semanas, $\frac{1}{2}$ N MS a las 3,48 y $\frac{1}{2}$ MS 2,07 semanas. Este dato nos indica que si pretendemos además utilizar el micelio en crecimiento activo, deberíamos utilizarlo antes de este punto de inflexión.

El crecimiento del hongo acidifica el medio significativamente, tal como se observa en la Tabla 6.3., la comparar el pH inicial en cualquiera de los 3 medios analizados, MMN, MS y $\frac{1}{2}$ MS, con el resultante derivado del crecimiento hasta un tamaño de 5 cm de la colonia fungica. En el medio MMN se obtiene el mayor descenso, llegando a un pH de 3,96 y el menor en el $\frac{1}{2}$ MS, descendiendo solamente hasta 4,6. Se observa que no hay diferencias significativas de pH entre las zonas con y sin crecimiento fúngico en ninguno de los 3 de los 3 medios. No se encontraron diferencias significativas en la bajada de pH entre los medios MMN y MS, pero si entre estos medios y el $\frac{1}{2}$ MS. Para optimizar la producción de inóculo fúngico es necesario el estudio y control de distintos parámetros que se modifican a lo largo del crecimiento fúngico en el cultivo. Asumiendo que las condiciones ambientales son estables, tal como se comprueba con el sensor termohigrométrico, la disminución del pH en el medio de cultivo, el agotamiento de algún elemento o sustancia esencial o incluso la acumulación de metabolitos tóxicos (French y Hebert, 1982).

Una vez determinado que el medio MS puede utilizarse como medio de cultivo fúngico con excelentes resultados, crecimos los hongos aislados en Nitrastur en este medio, obteniendo buenos resultados para *L. scabrum*, *S. citrinum* y *T. fulvum*, así como para un nuevo aislamiento de *P. ammoniavirescens*. En el caso *P. cuprinus* le dimos una especial atención ya que fue recientemente caracterizado y aislado (Jargeat *et al.*, 2014), desconociéndose su comportamiento en los medios de cultivo MMN, MS y $\frac{1}{2}$ MS. Los resultados obtenidos muestran que esta especie crece significativamente mejor en los medio MS y $\frac{1}{2}$ MS que en el medio MMN tanto en lo referente al área de crecimiento como a la biomasa generada. Al analizar las curvas de crecimiento se observa que al igual que *P. ammoniavirescens* esta especie presenta un crecimiento definido con unas curvas de crecimiento similares a *P. ammoniavirescens* pero sin llegar a alcanzar las velocidades logradas por esta. Al igual que en el caso anterior calculamos los punto de inflexión para los medios MS

y ½ MS, siendo estos a las 4,9 y 3,27 semanas respectivamente. Para el MMN no existe punto de inflexión al cabo de 5 semanas, pero debido al escaso crecimiento presentado es probable que en semanas posteriores viéramos este punto. Con estos datos parece que el medio MS y ½ MS pueden ser una alternativa para conseguir producir esta especie en grandes cantidades, aunque sin alcanzar los valores obtenidos con el hongo Pa L.

Una vez comprobado que el medio ½ MS es adecuado para el cultivo de los hongos micorrícicos aislados, y teniendo en cuenta que este medio también es adecuado para el cultivo in vitro de especies forestales, se realizó un co-cultivo para inducir la micorrización. Siguiendo una metodología similar a la utilizada por Malajckuk y Hartney (1986) en eucalipto, se inocularon plantas propagadas in vitro de *B. celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra* colocando el hongo directamente en el medio de cultivo donde estaba creciendo la planta. De esta manera se han obtenido micorrizas de *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* (Pa L) y *T. fulvum* en *B. celtiberica*. Especialmente destacables son los resultados de *P. ammoniavirescens* (Pa L) consiguiéndose una tasa de micorrización del 92%, por lo que este sistema podría emplearse para producir un gran número de plantas micorrizadas, siendo un método sencillo, rápido y efectivo. Sin embargo en *S. atrocinerea* y *P. nigra* no se consiguió la micorrización con este sistema. En el caso de *S. atrocinerea*, el hongo se desarrolla como un saprófito y provoca la muerte de la planta. Sin embargo si utilizamos el tubo pyrex, conseguimos que las raíces de *S. atrocinerea* se extendieran por toda la superficie del medio, logrando además la micorrización. Este hecho demuestra que las condiciones necesarias para los procesos de micorrización controlada son diferentes no solo dependiendo del hongo sino del hospedador y de las condiciones ambientales en donde se realicen. Con *P. nigra* probamos ambos sistemas, obteniendo el mismo resultado en ambos casos la necrosis de las raíces. Por lo que podríamos decir que estas dos especies serían incompatibles, ajustándose a la definición dada por Burgess *et al.* (1994).

Para *A. muscaria* con *B. celtiberica*, se observa lo que Burgess *et al.* (1994) denominaron una asociación parcialmente compatible, en la que existe un manto bien desarrollado y un intento de las hifas de penetración entre las células epidérmicas, pero no hay un desarrollo de red de Hartig. Se sabe por trabajos anteriores (Fernández, 2004) que aislamientos de *A. muscaria* procedentes de otras localidades próximas en Asturias son capaces de micorrizar *B. celtiberica* mediante otros sistemas. Por lo que en este caso parece que las condiciones de el sistema empleado no eran las optimas para esta especie.

Por último conseguimos una micorrización efectiva para las especies *S. citrinum* y *P. cuprinus* mediante la utilización de mezclas Turba - Vermiculita o Perlita, siendo además la primera vez que se logra la producción de micorrizas de *P. cuprinus* que se tenga constancia. Sistemas similares han sido utilizado por otros autores como con éxito (Marx y Kenny, 1982; Marx *et al.*, 1989) y aunque resulta una sistema relativamente fácil y efectivo, su aplicación a gran escala.

A lo largo de todo el proceso de cultivo y micorrización se observó la presencia de esclerocios en 3 de las especies de interés aisladas: *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens* y *T. fulvum*. La producción de estas estructuras por hongos ectomicorrícicos es infrecuente solo existiendo estudios en detalle para algunas especies como *Pisolithus tinctorius* o *Paxillus involutus* (Peterson *et al.*, 2004). Puesto que *P. ammoniavirescens* era la especie que más esclerocios presentaba y existen trabajos que describen los esclerocios de *P. involutus* (Grenville *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1991) decidimos estudiarlos en detalle. Los esclerocios maduros de *P. ammoniavirescens* presentan la misma organización interna descrita por Grenville *et al.* (1985) para *P. involutus*. Al igual que ellos observamos grandes depósitos de cuerpos proteicos en el interior de las hifas, estableciendo un gradiente de más a menos desde

la corteza hasta la médula y pequeños depósitos lipídicos periféricos en las células. Sin embargo ellos observan los depósitos lipídicos por todas las células de la médula, mientras que en nuestro caso solo se dan en las células próximas a la corteza y que denominan corticales. Adicionalmente observan una gran acumulación de polisacáridos a lo largo de todas las células corticales y medulares, encontrándonos en nuestro caso con polisacáridos carboxilados solo en la banda de hifas que presentan metacromasia (O'Brien *et al.*, 1964) y mucopolisacáridos en el centro medular. Aún con estos datos será necesario un análisis más exhaustivo para conocer la ultraestructura de los esclerocios de *P. ammoniavirescens*.

Se comprobó que los esclerocios de *P. ammoniavirescens*, al igual que los producidos por *Pisolithus tinctorius* (Peterson *et al.*, 2004), pueden ser utilizados como inóculo para generar micelio y posteriormente formar micorrizas. Estas estructuras de resistencia permiten mantener viable el hongo durante largos periodos de tiempo, tal como sugieren diferentes autores (Grenville *et al.*, 1985; Peterson *et al.*, 2004). Debido a esto sería interesante inducir e incrementar su producción en el medio de cultivo.

Algunos autores han puesto de manifiesto que la producción de esclerocios está influenciada por la fertilización nitrogenada y por la temperatura. Así Ekblund *et al.* (1995) observan que la bajada de N, en la fertilización en campo, incrementa la aparición de estas estructuras en *P. involutus*, mientras que su incremento provoca su disminución. Por otro lado Moore y Peterson (1992) observan también en *P. involutus* que la exposición del micelio a bajas temperaturas (8 °-14 °C) incrementa la aparición de esclerocios en cultivo puro. Basándonos en el efecto que estos dos factores provocan en un hongo del mismo género que *P. ammoniavirescens*, se estudió el efecto de la variación de N y de temperatura en esta especie, creciendo en el medio de cultivo MMN por ser que mayor número de esclerocios producía, y en los medios MS y ½ MS por ser los medios en los que esta especie presenta mayores crecimientos.

Para los medios MS y ½ MS se consigue un incremento significativo de la producción de esclerocios a 8 °C, ya que todos los cultivos contienen estas estructuras, mientras que a 23 °C solo se observan en 1 placa en MS y en 4 en ½ MS. Sin embargo, la mayoría de los esclerocios obtenidos son inmaduros o maduros de pequeño tamaño. Un resultado similar lo obtuvieron Moore y Peterson (1992) con el hongo *P. involutus* en el medio de cultivo MMN. La maduración de estos esclerocios inmaduros fue posible cuando se colocaron a 23 °C.

La producción y desarrollo de esclerocios en los medios MMN, MMN N+ y MMN N- fue muy diferente a la obtenida en los medios anteriores. El máximo de placas que desarrollan esclerocios fueron 4, de las 10 placas empleadas por tratamiento, con un total de 38 esclerocios maduros en el medio MMN N- a 8 °C. Aunque en otros tratamientos la producción de esclerocios fue inferior, no se encontraron diferencias significativas en el número de placas que producen esclerocios en estos 3 medios y a las temperaturas de 8, 10 y 23 °C.

Georgiou *et al.* (2006), a partir de sus trabajos con *Sclerotium rolfsii*, sugieren que la producción de esclerocios por hongos filamentosos está inducida por el incremento del estrés oxidativo. Someter al micelio a determinados compuestos (ácido yodoacético o yodatopotásico (Chet y Henis, 1968)) y, a factores ambientales (luz (Miller y Liberta, 1977), temperatura (Rudolph, 1962)) o a la limitación de nutrientes, causa un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la peroxidación de lípidos en el interior de la célula. Este hecho ha sido probado para diferentes especies de hongos filamentosos como *Sclerotinia sclerotium*, *Rhizoctonia solani* o *Sclerotium rolfsii*, pero no en especies ectomicorrizas. Sería necesario realizar ensayos que determinasen en las especies ectomicorrizas, si el incremento de estrés oxidativo aumenta la producción de esclerocios.

6.5. Bibliografía

- Agerer, R. (1990). Colour Atlas of Ectomycorrhizae. 4th Delivery. Einhorn, Schwäbisch Gmünd.
- Bormann C., Baier D., Hörr I., Raps C., Berger J., Jung G., Schawrz H. (1999). Characterization of a Novel, Antifungal, Chitin-Binding Protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. J Bact. 181:7421-7429.
- Burgess, T., Dell, B., Malajczuk, N. (1994). Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. New Phytol. 127:731-739.
- Chet, I., y Henis, Y. (1975). Sclerotial morphogenesis in fungi. Ann Rev Phytopathol. 13:169-192.
- Coley-Smith, J.R., y Cooke, R. C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. Ann Rev Phytopathol. 9:65-92.
- Danell, E. (1994). *Cantharellus cibarius*: Mycorrhiza formation and Ecology. Acta Univ. Ups., Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 35. pp. 75. Uppsala. ISBN 91- 554-3273-5.
- Deacon, J.W., Donaldson, S.J., Last, F.T. (1983). Sequences and intereactions of mycorrhizal fungi on birch. Plant Soil. 71:257-262.
- Fernández, MT. (2004). Selección de hongos ectomicorrícicos para su empleo en revegetación de zonas degradadas por la actividad minera. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González A., Tamés, R.S. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. Environ Pollut. 152: 522-529.
- Ekblad, A., Wallander, H., Carlsson, R., Huss-Danell, K. (1995). Fungal biomass in roots and extramatrical mycelium in relation to macronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Alnus incana*. New Phytol. 131:443-451.
- French, E.R., y Hebert, T.T. (1982). Métodos de investigación fitopatológica(Vol. 43). Ilca. pp. 289.
- Georgiou, C.D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., Zervoudakis, G. (2006). Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. Integrative and comparative Biology. 46:691-712.
- Goodman D.M., Durall D.M., Trofymow J.A, Berch S.M. (1996). A manual of concise descriptions of north american ectomycorrhizae. Mycologue Publications, and the Canada-BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria, B.C.
- Grenville, D.J., Peterson, R.L., y Piché, Y. (1985). The development, structure, and histochemistry of sclerotia of ectomycorrhizal fungi. II. *Paxillus involutus*. Can J Bot. 63:1412-1417.

- Gryta, H., Debaud, J.C., Effosse, A., Gay, G., Marmeisse, R. (1997). Fine scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Mol Ecol.* 6:353-364.
- Ingleby, K., Manson, P.A., Last, F.T., Fleming, L.V. (1990). Identification of ectomycorrhizas. *Institute of Terrestrial Ecology Res. Publ no 5*, pp. 112.
- Jargeat, P., Chaumeton, P-M., Navaud, O., Vizzini, A., Gryta, H. (2014). The *Paxillus involutus* (*Boletales, Paxillaceae*) complex in Europe: Genetic diversity and morphological description of the new species *Paxillus cuprinus*, typification of *P. involutus* s.s., and synthesis of species boundaries. *Fungal Biol.* 118:12-31.
- Kropp, B.R. y Langlois, C.G. (1990). Ectomycorrhizae in reforestation. *Can J Forest Res.* 20:438-451.
- Malajczuk, N. y Hartney, V.J. (1986). Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camaldulensis* with ectomycorrhizal fungi, and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. *Aust Forest Res.* 16:199-206.
- Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* 59: 153-163.
- Marx, D.H. y Cordell, C.E. (1989). The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. Wippa, J.M. y Lumsdem, R.D. (Eds.). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Marx, D.H. , Cordell, C.E., Maul SB, Ruehle JL. (1989). Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculation formulations. *New Forests* 3:45-56.
- Marx, D.H. y Kenney DS. (1982). Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. En: Schenck, N.C. (Ed). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society, St Paul, 131-146.
- Mason, P.A., Wilson, J., Last, F.T., Walker, C. (1983). The concept of succession in relation with the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soil. *Plant Soil.* 71:247-256.
- Miller, R.M. y Liberta, A.E. (1977). The effects of light and tyrosinase during sclerotium development in *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Can J Microbiol.* 23:278-287.
- Molina, R. y Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenck, N.C. (Ed.). *Am Phytopath Soc., St. Paul, MN.* pp. 115-129.
- Molina, R., y Trappe, J.M. (1982). Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Sci.* 28:423-458.
- Moore, A.E.P., Ashford, A.E., Peterson, R.L. (1991). Reserve substances in *Paxillus involutus* sclerotia. *Protoplasma.* 163:67-81.

- Moore, A.E.P. Peterson, R.L. (1992). Effect of temperature on sclerotium induction in *Paxillus involutus*. Can J Microbiol. 38:1197-1201.
- Moser, M. (1960). Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas 4. J. Bad Heilbrunn. pp. 440.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497.
- O'brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma. 59:368-373.
- Pera, J. (1992). Selección de hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. (2004). Mycorrhizas: anatomy and cell biology. CABI.
- Rudolph, E.D. (1962). The effect of some physiological and environmental factors on sclerotial *Aspergilli*. Am J Bot. 71-78.



CONCLUSIONES

Conclusiones

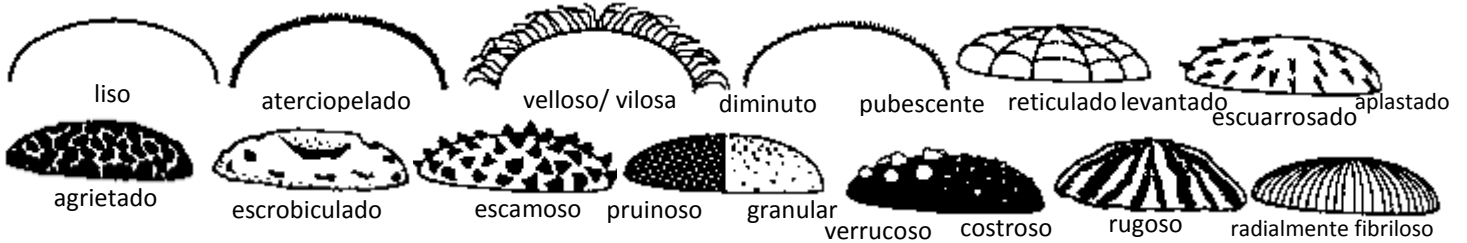
1. La temperatura de secado afecta al contenido de metales de los esporocarpos en diferentes especies, siendo superior en las muestras secadas a 35 °C que a 70 °C. Esta diferencia se ha observado además mediante las dos metodologías de medición utilizada, ICP-MS y XRF, por lo que asumimos la liberación de compuestos volátiles a la temperatura de 70 °C.
2. Se ha determinado que existe una acumulación significativamente superior de Se, Cu y Zn en los tejidos externos de los esporocarpos de las especies *Amanita muscaria*, *A. phalloides*, *Leccinum scabrum* y *Paxillus cuprinus*.
3. De las 14 especies analizadas mediante XRF se ha determinado que *Hebeloma sinapizans* es la especie que más metales acumula (Cu, Se, Cd, Zn y Pb). En cuanto a la acumulación de metales individualmente podemos decir que, *H. mesophaeum* es la que más Cd y Zn acumula, *H. sinapizans* la que más Cu y Se acumula, *A. muscaria* de El Terronal hiperacumula Hg y *Volvopluteus gloicephalus* acumula As.
4. Mediante la utilización del ICP-MS se han podido confirmar que los resultados obtenidos mediante XRF para el Se, Zn, Cu o Cd son similares con correlaciones elevadas o moderadas a los dados por el ICP-MS, por lo que se podrían utilizar ambas técnicas para la medición de estos metales, mientras que para el Pb el XRF sobrestima unos 80 mg Kg⁻¹ y en el caso del As los subestima. Con los datos obtenidos mediante ICP-MS se ha podido demostrar que *A. muscaria* hiperacumula Hg (119,58 mg Kg⁻¹), *Leccinum scabrum* acumula Pb (58,27 mg Kg⁻¹), *P. cuprinus* hiperacumula Fe (1069,94 mg Kg⁻¹) y *Volvopluteus gloicephalus* acumula As (92,17 mg Kg⁻¹).
5. Del muestreo de las raíces de la parcela altamente contaminada de Nitrastur, se ha determinado que el género *Scleroderma* parece ser abundante en las plantas juveniles, ya que se han encontrado las especies *S. citrinum* asociada a abedul y *S. bovista* asociada a chopo. Asimismo, se ha determinado la presencia de dos helotiales, *Cadophora finlandica* en sauce y un Ascomycete próximo a las familias *Hyalocyphaceae* y *Heloticeae*, que generan estructuras que morfológicamente se ajustan a la definición de ectomicorrizas, así como microesclerocios típicos de endófitos septados oscuros, en el mismo sistema radicular aunque en diferentes raíces.
6. Se ha demostrado la presencia de hongos arbusculares infectando las raíces de individuos juveniles de *Betula celtiberica*, *Salix atrocinerea* y *Populus nigra* de una zona altamente contaminada, y coexistiendo en todos los casos con otras asociaciones fúngicas (ectomicorrizas y/o endófitos). La existencia de este tipo de hongos en la rizosfera de los individuos se ha visto además demostrada ya que se ha conseguido la producción de esporas de 5 géneros diferentes: *Acaulospora*, *Archaespora*, *Glomus*, *Septoglomus* y *Paraglomus*.
7. Mediante el análisis filogenético de las muestras se han conseguido una correcta identificación las especies, así como establecer la realacion entre un origen geográfico como en el caso de *Amanita muscaria* (Grupo Euroasiatico) o *Scleroderma bovista* (Grupo Europeo) o una vinculación al hospedador como *T. cingulatum* (género *Salix*).

8. Se consiguió el aislamiento y cultivo de las especies *Amanita muscaria*, *Cortinarius alboviolaceus*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. sinapizans*, *Laccaria laccata*, *Lactarius pubescens*, *Leccinum scabrum*, *Paxillus ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *Scleroderma citrinum*, *Tricholoma cingulatum* y *T. fulvum*, así como la micorrización *in vitro* de *Betula celtiberica* con las especies *L. scabrum*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *S. citrinum*, y *T. cingulatum* y de *Salix atrocinerea* con *P. ammoniavirescens*.
9. Se ha determinado que el medio MS y sus variaciones resultan indicadas para el crecimiento y producción de *P. ammoniavirescens* y *P. cuprinus*, mejorando adicionalmente el cultivo de los otros hongos aislados.
10. Se ha confirmado que los esclerocios maduros de *P. ammoniavirescens* pueden ser utilizados como inóculo tanto para generar micelio como para micorrizar. Asimismo, se determina que su formación se ve influenciada por la exposición a la temperatura de 8° C, sufriendo un incremento significativo en el número de placas que producen estas estructuras al someter al micelio crecido en los medios MS y ½ MS a esta temperatura.

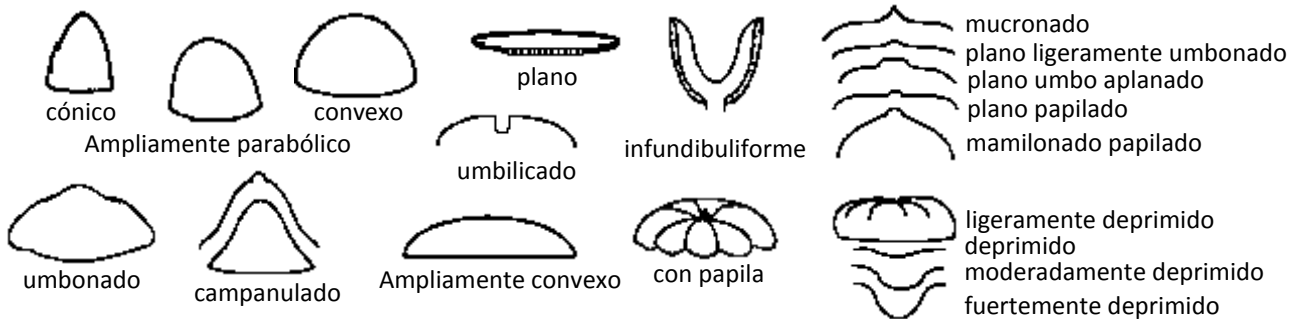


Nº: _____ Colector: _____ Fecha: _____ Localización: _____
 Especie hospedadora: _____
 Olor: _____ Sabor: _____ Tamaño píleo: _____ cm, mm Color píleo: _____
 Superficie Píleo: seco/húmedo/brillante/sedoso/opaco/viscoso/pegajoso/aceitoso
 Superficie Estipe: seco/húmedo/brillante/sedoso/opaco/viscoso/pegajoso/aceitoso
 Color interno: _____ Reacción KOH/NH₄: _____ / _____

Superficie del Píleo



Forma del Píleo

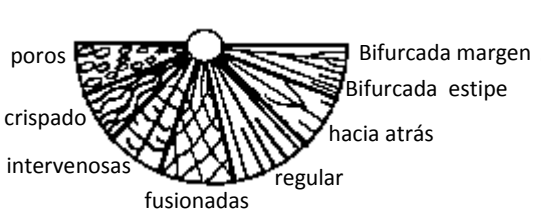
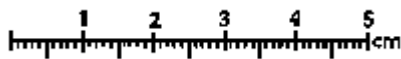


Margen del Píleo

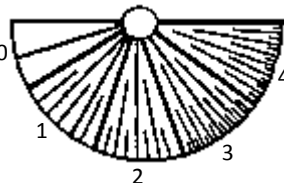


Láminas

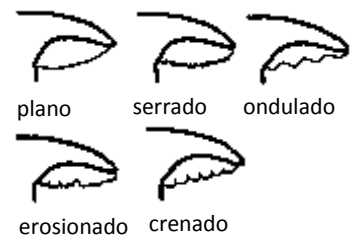
Color: _____ Espacio entre laminas al margen ≥ 1 mm 2/mm 3/mm >3/mm
 Ancho: _____ Espacio entre a 1/2 distancia del margen ≥ 1 mm 2/mm 3/mm >3/mm



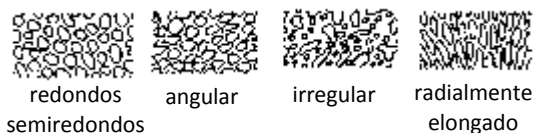
Lamelulas



Margen

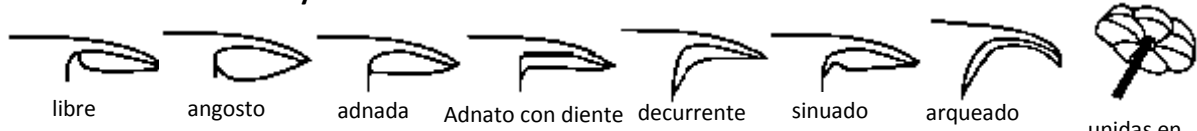


Forma del poro

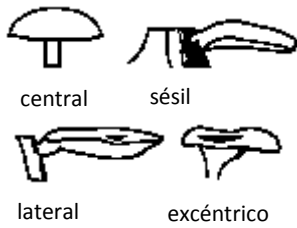


Color tubo: _____
 Color poro: _____
 Longitud: _____ Diámetro: _____

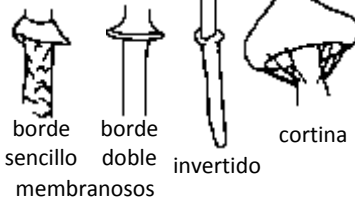
Unión de las Láminas y tubos



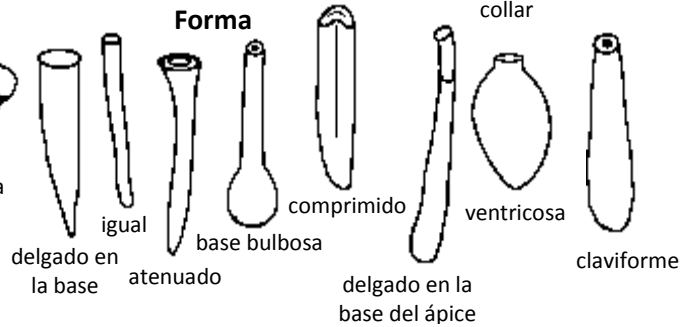
Posición del Estipe



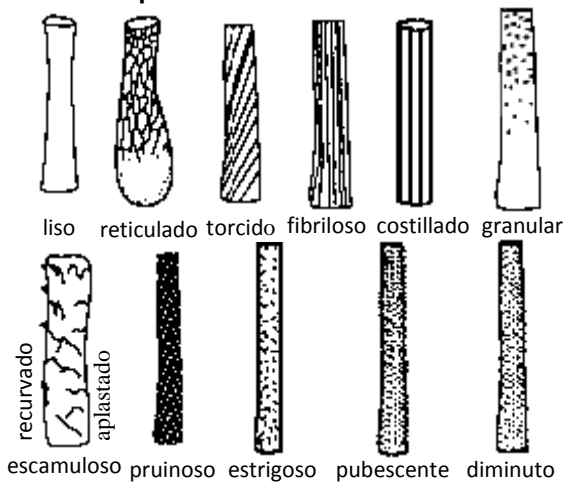
Anillo



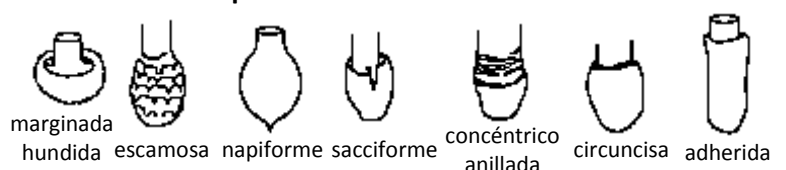
Forma



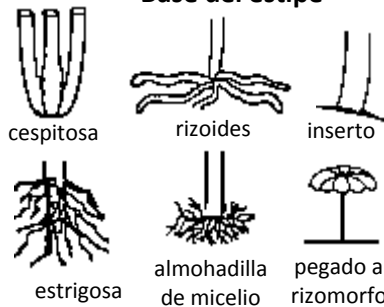
Superficie



Tipo de volva



Base del estipe

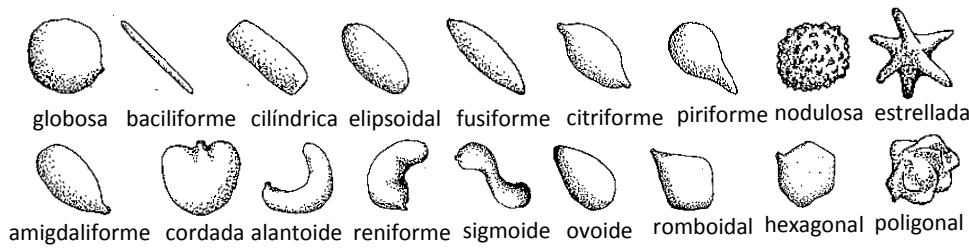


Longitud:
Ancho:
Color:

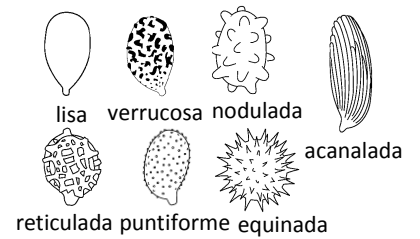
Contenido

Sólido / Relleno/ Hueco

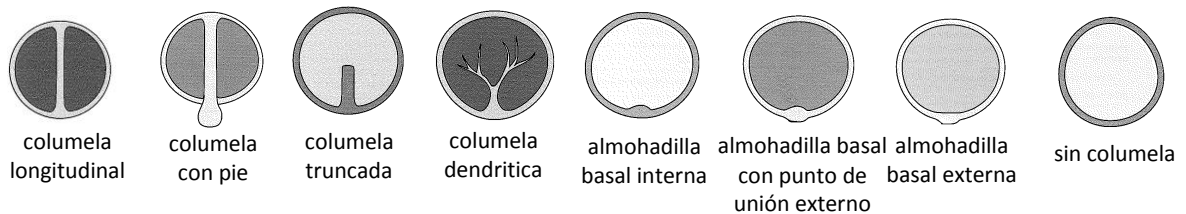
Forma de las esporas



Ornamentación



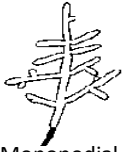
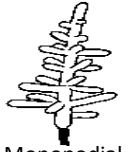



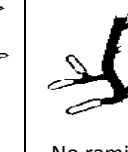
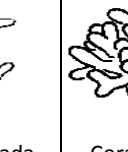
Hipogeos








Observaciones:

(Andres, J. et al. (1992), Brundrett, M. et al. (1996) y Lodge, D.J et al. (2004)



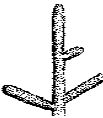






Tipo de ramificación:

						
Monopodial-pinnada	Monopodial-piramidal	Dicotomicas	Tuberosas	Irregular	No ramificada	Coraloides

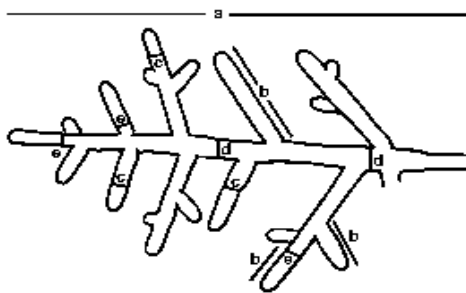
Forma:

				
Derecha	Moldeada	Club-shaped	Tortuosa	Doblada, inclinada

Textura:

								
Lisa	Reticulada	Granulosa	Tuberculosa	Lanosa	Algodonosa	Aterciopelada	Fibrosa	Espinosa

Dimensiones:



- a = longitud del sistema =
- b = longitud de la punta =
- c = ancho de la punta =
- d = ancho del eje mayor =
- e = ancho de la base de punta =

Color:


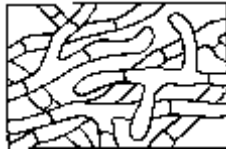
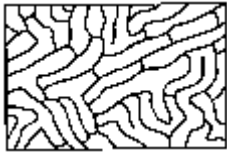
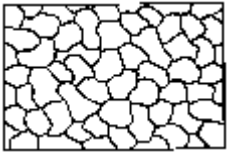
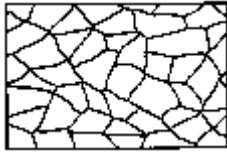
Lustre:

- Mate:
- Brillante:
- Reflectante:

Observaciones:

(Agerer, R. (1990) y Goodman, D.M. *et al.* (1996))

Estructura del manto:

				
Prosenquima deshilachado	Prosénquima en estructura de red	Pseudoparenquima en estructura de red	Pesudoparenquima irregular	Pseudoparenquima regular

Extensión de la red de Hartig:

Ornamentación:

- Cristaloide:
- Verrugosa:
- Globular:

Observaciones:

(Goodman, D.M. *et al.* (1996) e Ingleby, K. *et al.* (1990))

<i>Amanita</i>						
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor	
<i>A. concentrica</i>	FB-24901(CBM)	AB080783	Awa-gun, Japón	¿?	Oda et al., 2002	
<i>A. farinosa</i>	A6	FJ441036	Yunnan, China	¿?	Cao et al., 2008 Sin publicar	
<i>A. gemmata</i>	UBC F19764	HQ604824	Columbia Británica, Inglaterra	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Berbee et al., 2014 Sin publicar	
<i>A. melleiceps</i>	LEM970723	AB015688	Ohita-shi, Japón	¿?	Oda et al., 1999	
<i>A. muscaria</i>	FB-30961(CBM)	AB080980	Aomori-shi, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 2002	
	FB-30976(CBM)	AB081294	Kiso-gun, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 1999	
	FB-30987(CBM)	AB096052	Queenstown, Nueva Zelanda	¿?	Oda et al., 2004	
	FB-30964(CBM)	AB080983	Gdynia, Polonia	¿?	Oda et al., 2002	
	FB-30962(CBM)	AB080982	Chino-shi, Japón	¿?	Oda et al., 2004	
	FB-30963(CBM)	AB080981	Chino-shi, Japón	¿?	"	
	M-80048(K)	AB080779	Surrey, Inglaterra	¿?	Oda et al., 2002	
	M-31445(K)	AB080778	Surrey, Inglaterra	¿?	"	
	LEM950025	AB015700	Kaida-mura, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 1999	
	LEM950048	AB081295	Ohno-gun, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	"	
	FB-30985(CBM)	AB096048	Ohno-gun, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 2004	
	M-31452(K)	AB080777	Hampshire, Inglaterra	¿?	Oda et al., 2002	
	FB-30965(CBM)	AB080984	Gdansk, Polonia	¿?	"	
	45840(NY)	AB080791	Lawrence, EEUU	¿?	Oda et al., 2004	
	45863(NY)	AB080787	Mendocino, EEUU	¿?	"	
	45785(NY)	AB080789	Hampshire, EEUU	¿?	"	
	45820(NY)	AB080790	Bronx, EEUU	¿?	"	
	<i>var. alba</i>	HDT49100(SFSU)	AB080793	Cascade, EEUU	¿?	"
	<i>var. formosa</i>	HDT45060(SFSU)	AB080795	Amador, EEUU	¿?	"
		HDT44761(SFSU)	AB080794	Alpine, EEUU	¿?	"
		45883(NY)	AB080792	Piscataquis, EEUU	¿?	"
		45843(NY)	AB080788	Hampshire, EEUU	¿?	"
	<i>var. regalis</i>	1539(O)	AB080781	Gjøvik, Noruega	<i>Picea sp.</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 2002
FB-309778(CBM)		AB081296	Chino-shi, Japón	<i>Abies veitchii</i> <i>A. mariesii</i> <i>Betula ermanii</i>	Oda et al., 1999	
506(O)		AB080780	Dovre, Noruega	<i>Picea sp.</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 2002	
4220(O)		AB080782	Nordre-Land, Noruega	<i>Picea sp.</i> <i>Betula sp.</i>	"	
FB-30981(CBM)		AB096049	Chino-shi, Japón	<i>Abies veitchii</i> <i>A. mariesii</i> <i>Betula ermanii</i>	Oda et al., 2004	
FB-30982(CBM)		AB096050	Chino-shi, Japón	<i>Abies veitchii</i> <i>A. mariesii</i> <i>Betula ermanii</i>	"	
<i>A. pantherina</i>		FB-30957(CBM)	AB080974	Ohno-gun, Japón	<i>Pinaceae</i> <i>Betula sp.</i>	Oda et al., 2002
<i>A. rubrovolvata</i>	FB-30954(CBM)	AB015689	Ohno-gun, Japón	¿?	Oda et al., 1999	
<i>A. subfrostiana</i>	HKAS 58847	JN943172	Yunnan, China	¿?	Schoch et al., 2012	
<i>A. sychnopynamis</i>	LEM960112a	AB015690	Oh tsu-shi, Japón	¿?	Oda et al., 1999	
Grupo externo						
<i>A. pseudoporphyria</i>	LEM960037a	AB015702	Midorogaike, Japón	¿?	Oda et al., 1999	

<i>Hebeloma</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>H. aestivale</i>	GLM 44051	AY308582	Aarhus, Dinamarca	<i>Quercus sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. albocolossum</i>	IB95/57	AY308583	Skibotndalen, Noruega	<i>Betula pubescens</i>	"
<i>H. alboerumpens</i>	JVG1080108	JQ751217	España	¿?	Eberhardt et al., 2013
<i>H. atrobrunneum</i>	GLM44051	AY308586	Horsens, Dinamarca	<i>Salix sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. birrum</i>	KDAd580	AF124693	Callanstoog, Holanda	<i>Quercus sp.</i>	Aanen et al., 2000
<i>H. brunneifolium</i>	L 0490421	AY309959	Overijssel, Holanda	<i>Quercus sp.</i> <i>Salix sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. bryoogenes</i>	C21581	AY309960	Varsinais, Finlandia	<i>Pinus sylvestris</i> <i>Picea abies</i> <i>Betula sp.</i>	"
<i>H. bulbiferum</i>	PR21860	AF124673	Francia	<i>Pinus sp.</i>	Aanen et al., 2000
<i>H. calyptosporum</i>	IB93/53	AY309961	Hungerburg, Austria	<i>Picea sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. cavipes</i>	LY66BR106	AF124670	Francia	¿?	Aanen et al., 2000
<i>H. circinans</i>	DKAd638	AF124699	Jura, Francia	<i>Picea sp.</i>	"
<i>H. collariatum</i>	DKAd565	AF124691	Lelystad, Holanda	<i>Salix sp.</i>	"
<i>H. crustuliniforme</i>	DKAm503-2	AF124668	Borgsjö, Suecia	<i>Betula sp.</i>	"
<i>H. cylindrosporium</i>	Am6100	AF124695	Dwingeloo, Holanda	<i>Pinus sp.</i>	"
<i>H. erumpens</i>	JV05-740	EU570185	Girona, España	<i>Cistus monspeliensis</i> <i>C. albidus</i>	Eberhardt et al., 2009
<i>H. fragilipes</i>	GLM42703	AY309964	Sachsen, Alemania	<i>Tilia sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. griseopruinatum</i>	JHC09-174	JQ751183	Dinamarca	¿?	Eberhardt et al., 2013
<i>H. helodes</i>	dkad538	AF124687	Beilen, Holanda	<i>Salix sp.</i>	Aanen et al., 2000
<i>H. hiemale</i>	LY66BR104	AF124669	Francia	¿?	"
<i>H. incarnatulum</i>	DKAd527	AF124684	Roth, Alemania	<i>Pinus sp.</i>	"
<i>H. leucosarx</i>	GLM40669	AY311517	Sachsen, Alemania	<i>Tilia sp.</i> <i>Carpinus sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. malenconil</i>	IB 94/419	AY311519	Cerdeña, Italia	<i>Quercus ilex</i>	"
<i>H. mesophaeum</i>		AB327182	Hokkaido, Japón	<i>Salix sp.</i> <i>Populus sp.</i>	Obase et al., 2007
	SR-108	HE649369	Pakistan	¿?	Razaq y Khalid, 2011 Sin publicar
	GLM31004	AF126100	Centro Europa	¿?	Boyle, 1999 Sin publicar
	UU_3b_l	JQ724062	Suecia	<i>Salix sp.</i>	Hryniewicz et al., 2012
		EF091826	Ruaudin, Francia	¿?	Mondiet et al., 2007
	IB2005309	EF644106	Arnoldstein, Austria	<i>Populus tremula</i>	Krpata et al., 2008
		EF451057	¿?	¿?	Vesterholt et al., 2008 Sin publicar
		EF091827	Villars-sur Glane, Suiza	¿?	Mondiet et al., 2007
	Nara_HeM01	AB211272	Shizuoka, Japón	<i>Salix reinii</i>	Nara, 2006
		HQ453395	Alemania	<i>Salix caprea</i>	Hryniewicz et al., 2011
DKAd572	AF124692	Terschelling, Holanda	<i>Salix sp.</i>	Aanen et al., 2000	
	SMI294	FJ845404	Columbia Britanica, Canada	<i>Pinus contorta</i> <i>Abies lasiocarpa</i> <i>Picea glauca x englemann</i>	Kranabetter et al., 2009
	2734	FJ168580	Colorado, EEUU	¿?	Slot et al., 2010
<i>H. monticola</i>	GLM 44052	AY311523	Pohjois-Karjala, Finlandia	¿?	Boyle et al., 2006
<i>H. nigellum</i>	GLM 44055	AY311524	Grønland, Dinamarca	¿?	"
<i>H. pallidoluctuosum</i>	GLM45575	AY311526	Sachsen, Alemania	<i>Tilia sp.</i> <i>Betula sp.</i>	"
<i>H. pallidum</i>	JE	AY312976	Cerdeña, Italia	<i>Pinus sp.</i>	"
<i>H. parvicystidium</i>	JV06-1090	JQ751205	Italia	¿?	Eberhardt et al., 2013
<i>H. polare</i>	GML44054	AY312977	Svalbard, Noruega	<i>Salix sp.</i>	Boyle et al., 2006
<i>H. populinum</i>				<i>Populus tremula</i>	
	GML41872	AY312978	Sachsen, Alemania	<i>Betula sp.</i> <i>Pinus sp.</i> <i>Quercus sp.</i>	"
<i>H. psammophilum</i>	GML44053	AY312980	Hirtshals, Dinamarca	¿?	"
<i>H. pumilum</i>	IB1992/0061	AY312981	Matrei, Austria	<i>Picea sp.</i> <i>Larix sp.</i>	"
<i>H. pusillum</i>	dkad654	AF124706	Jura, Francia	<i>Salix sp.</i>	Aanen et al., 2000
<i>H. radicosum</i>	DKAd640	AF124700	Jura, Holanda	<i>Quercus</i>	"
<i>H. remyi</i>				<i>Salix sp.</i>	
	IB 98/460	AY312983	Lapland, Finlandia	<i>Betula sp.</i>	Boyle et al., 2006

<i>H. sacchariolens</i>	DKAd552	AF124689	Rheebruggen, Holanda	<i>Salix sp.</i>	Aanen <i>et al.</i> , 2000
<i>H. sarcophyllum</i>	LY65BR25	AF124715	Francia	¿?	"
<i>H. sinapizans</i>	DKAd641	AF124682	Roth, Alemania	<i>Picea sp.</i> <i>Pinus sp.</i>	"
<i>H. sordidum</i>	JV86-862	EF451056	¿?	¿?	Vesterholt <i>et al.</i> , 2008 Sin publicar
	GLM43508	AY311521	Sachsen, Alemania	<i>Tilia sp.</i> <i>Betula sp.</i>	Boyle <i>et al.</i> , 2006
<i>H. stenocystis</i>	JE	AY320392	Thüringen, Alemania	<i>Picea sp.</i> <i>Pinus sp.</i>	"
<i>H. subconcolor</i>	IB 98/462	AY320393	Finnmark, Noruega	<i>Salix sp.</i>	Boyle <i>et al.</i> , 2006
<i>H. syrjense</i>	JV97-310	JQ751195	Suecia	¿?	Eberhardt <i>et al.</i> , 2013
<i>H. testaceum</i>	L0490468	AY320395	Flevoland, Holanda	<i>Quercus sp.</i>	Boyle <i>et al.</i> , 2006
<i>H. theobrominum</i>	ROHB:925LQ	JX275966	¿?	¿?	Eberhardt <i>et al.</i> , 2013
<i>H. vaccinum</i>	GLM 43968	AY320396	Brandenburgo, Alemania	<i>Salix sp.</i>	Boyle <i>et al.</i> , 2006
				<i>Populus sp.</i>	
<i>H. versipelle</i>	L0490475	AY320397	Overijssel, Holanda	<i>Fagus sp.</i>	"
<i>H. vesterholtii</i>	HJB1000133	FJ816627	Belgica	¿?	Eberhardt <i>et al.</i> , 2010
<i>H. vinosophyllum</i>	L0490435	AY320398	Honshu, Japón	<i>Pinus sp.</i>	Boyle <i>et al.</i> , 2006
Grupo externo					
<i>Naucoria escharoides</i>	PBM1687	AY900078	Prater Creek, EEUU	¿?	Moreau <i>et al.</i> , 2006

Inocybe					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>I. agardhii</i>	AB980912	HM209790	Escandinavia	¿?	Larsson y Vauras, 2010 Sin publicar
<i>I. dulcamara</i>	EL304	AM882859	Suecia	¿?	Ryberg <i>et al.</i> , 2008
	UBC F19338	HQ604782	Columbia Británica, Canadá	<i>Pseudostuga menziesii</i> <i>Arbutus menziesii</i>	Berbee <i>et al.</i> , 2010 Sin Publicar
	UBC F19398	HQ604781	Columbia Británica, Canadá	Bosque	"
	UBC F19170	HQ604778	Wenatchee Lake, EEUU	¿?	"
	KH38	GU234071	Svalbard, Noruega	Tundra	Geml <i>et al.</i> , 2012
	KH37	GU234129	Svalbard, Noruega	Tundra	"
	KH39	GU234082	Svalbard, Noruega	Tundra	"
	UBC F19149	HQ604784	Columbia Británica, Canadá	<i>Pseudostuga menziesii</i>	Berbee <i>et al.</i> , 2010 Sin Publicar
	EL5905	AM882863	Noruega	¿?	Ryberg <i>et al.</i> , 2008
EL3305	AM882854	Noruega	¿?	"	
<i>I. fulvipes</i>	EL3705	AM882858	Noruega	<i>Dryas sp.</i> <i>Salix sp.</i>	Ryberg <i>et al.</i> , 2008
<i>I. leucoblema</i>	SEB9709	AM882857	Suecia	¿?	Ryberg <i>et al.</i> , 2008
<i>I. malenconii</i>	SJ030822	AM882862	Suecia	¿?	"
<i>I. terrigena</i>	EL11704	AM882864	Suecia	<i>Picea sp.</i>	Larsson <i>et al.</i> , 2009
<i>I. unicolor</i>	PBM 2589	EU523554	Tennessee, EEUU	¿?	Hughes <i>et al.</i> , 2008 Sin publicar
Grupo externo					
<i>Crepidotus mollis</i>	EL4504	AM882996	Suecia	¿?	Ryberg <i>et al.</i> , 2008

<i>Lactarius</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>L. acris</i>	EU01	DQ421988	Alemania	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. albocarneus</i>	3249	JF908303	Italia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
<i>L. aquizonatus</i>	15167	JF908320	Italia	¿?	"
<i>L. auriolla</i>	UP537	DQ658886	Rammsele, Suecia	<i>Picea abies</i>	Nygren <i>et al.</i> , 2007
<i>L. camphoratus</i>	UE04.09.2004-5	DQ422009	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. citriolens</i>	UE20.09.2004-03	DQ422003	Suecia	¿?	"
<i>L. deliciosus</i>	J. Vesterholt 96-312	DQ922488	Nordjylland, Dinamarca	<i>Pinus sp.</i>	Nuytinck y Verbeken, 2007
<i>L. fennoscandicus</i>	J. Vesterholt 95-330	DQ922500	Jämtland, Suecia	<i>Picea sp.</i>	"
<i>L. flexuosus</i>	UE06.09.2002-1	DQ421992	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. hepaticus</i>	Lh B	AF096989	¿?	¿?	Marin <i>et al.</i> , 2001 Sin publicar
<i>L. illyricus</i>	14644	JF908315	Italia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
<i>L. lanceolatus</i>	O73608	GU234010	Svalbard, Noruega	¿?	Geml <i>et al.</i> , 2012
<i>L. lignyolotus</i>	UE06.09.2003-5	DQ421993	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. mairei</i>	GENT AV 2000-105	AY336952	Cerdeña, Italia	<i>Cistus sp.</i>	Nuytinck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. mammosus</i>	GG415_86	GU234062	Svalbard, Noruega	¿?	Geml <i>et al.</i> , 2012
<i>L. picinus</i>	R.Walley 3703 (GENT)	GU258279	Republica Checa	¿?	Stubbe <i>et al.</i> , 2010
<i>L. piperatus</i>	UE09.08.2004-6	DQ422035	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. porninsis</i>	J. Nuytinck 2001-082	DQ922547	Žilina, Eslovaquia	<i>Picea abies</i> <i>Larix decidua</i>	Nuytinck y Verbeken, 2007
<i>L. pubescens</i>	hue135, TUB	AY606953	Tuebingen, Alemania	<i>Betula sp.</i>	Eberhardt y Verbeken, 2004
	DG27	JQ888184	Culbin, Escocia	<i>Pinus sp.</i>	Pickles <i>et al.</i> , 2012
	UE15.09.2002-2	DQ421996	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
	UP516	DQ658884	Uppsala, Suecia	<i>Betula sp.</i>	Nygren <i>et al.</i> , 2007
	GENT AV 96-931	AY336958	Nannenstad, Noruega	<i>Cistus sp.</i>	Nuytinck <i>et al.</i> , 2004
	10	JX145397	China	<i>Ostryopsis davidiana</i>	Xue, 2012 Sin publicar
<i>L. quieticolor</i>	UE10.09.2004-1	DQ422002	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. romagnesii</i>	UE29.09.2002-6	DQ421989	Francia	¿?	"
<i>L. salmonicolor</i>	A. Verbeken 98-056	DQ922551	Belfort, Francia	<i>Abies sp.</i>	Nuytinck y Verbeken, 2007
<i>L. sanguifluus</i>	(GENT) AV 99-246	AY332544	Salignac, Francia	<i>Pinus sylvestris</i>	Nuytinck y Verbeken, 2003
<i>L. scrobiculatus</i>	fo46774	AF140262	Tuebingen, Alemania	<i>Picea abies</i>	Eberhardt <i>et al.</i> , 2000
<i>L. semisanguifluus</i>	(GENT) CL 96-081	AY332555	Gotland, Suecia	<i>Pinus sp.</i>	"
<i>L. serifluus</i>	(GENT) RW 1431	AY332558	Melreux, Bélgica	¿?	Nuytinck <i>et al.</i> , 2003
<i>L. spinosulus</i>	GENT LVL 2002-016	AY336960	Fôret de Dorans, Francia	<i>Cistus sp.</i>	Nuytinck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. subsericatus</i>	UE11.10.2004-8	DQ422011	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. trivialis</i>	UE27.08.2002-17a	DQ421991	Suecia	¿?	"
<i>L. tuomikoskii</i>	UP576	EF493292	Uppsala, Suecia	Bosque mixto	Nygren <i>et al.</i> , 2008
<i>L. utilis</i>	16408	JF908322	Italia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
<i>L. vellereus</i>	UE20.09.2004-22	DQ422034	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. vietus</i>	2006 09 12 3	JQ888186	Culbin, Escocia	<i>Pinus sp.</i>	Pickles <i>et al.</i> , 2012
<i>L. vinosus</i>	(GENT) JN 2001-104a	AY332551	España, Cataluña	<i>Pinus</i>	Nuytinck y Verbeken, 2003
<i>L. volemus</i>	UE09.08.2004-5	DQ422008	Suecia	¿?	Buyck <i>et al.</i> , 2008
<i>L. zonarius</i>	UE27.09.2002-4	EU278678	Francia	¿?	"
<i>L. zonarioides</i>	2516	JF908300	Italia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
Grupo externo					
<i>Gloeocystidiellum porosum</i>	EB990923	AY048881	Dinamarca	¿?	Larsson y Larsson, 2003

<i>Leccinum</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>L. aurantiacum</i>	SMI273	FJ845423	Columbia Británica, Canadá	<i>Pinus contorta</i> <i>Abies lasiocarpa</i> <i>Picea glauca x englemann</i>	Kranabetter <i>et al.</i> , 2009
	rw1656	AF454569	Ardennes, Francia	¿?	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
	KR5	EF517299	Praga, Republica Checa	<i>Betula pendula</i> <i>Salix sp.</i>	Soukupová <i>et al.</i> , 2008
<i>L. brunneogriseolum</i>	hdb039	AF454560	Schiermonnikoog, Holanda	<i>Betula sp.</i>	den Bakker <i>et al.</i> , 2004b
<i>L. carpini</i>	Hdb065	AF454588	Breukelen, Holanda	<i>Carpinus sp.</i> <i>Corylus sp.</i>	"
<i>L. crocipodim</i>	17388	JF908325	Italia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
	rw1659	AF454589	Ardennes, Francia	<i>Carpinus sp.</i>	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
	RC.F94.103	JN021053	Francia	¿?	Dentinger <i>et al.</i> , 2011
	deVries	AF454590	Zeist, Holanda	¿?	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
<i>L. duriusculum</i>		AF454577	Wassenaar, Holanda	<i>Populus sp.</i>	"
	wt001	AF454576	Wassenaar, Holanda	<i>Populus sp.</i>	"
<i>L. holopus</i>	hdb076	AF454563	Kall, Suecia	¿?	"
	hdb40	AF454561	Nieuwkoop, Holanda	<i>Betula sp.</i>	"
	hdb085	AF454562	Sogndal, Noruega	¿?	"
<i>L. lepidum</i>	SU70	DQ131631	Cerdeña, Italia	¿?	Mello <i>et al.</i> , 2006
<i>L. palustre</i>	hdb015	AF454587	Borgsjö, Suecia	¿?	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
	hdb030	AF454586	Amsterdamse, Holanda	¿?	"
<i>L. piceinum</i>	men2048 Clon 2	AF454579	Obertiliach, Austria	<i>Picea sp.</i>	"
	men2048 Clon 1	AF454578	Obertiliach, Austria	<i>Picea sp.</i>	"
<i>L. pulchrum</i>	hdb037	AF454568	Nieuwkoop, Holanda	¿?	"
<i>L. quercinum</i>		AF454591	Holanda	¿?	"
<i>L. rigidipes</i>	hdb042	AF454584	Sogndal, Holanda	¿?	"
<i>L. roseofractum</i>		AF454565	Holanda	¿?	"
<i>L. roseotinctum</i>	hdb74	AF454575	Kall, Suecia	¿?	"
<i>L. rotundifoliae</i>	hdb086	AF454581	Jotunheimen, Noruega	<i>Betula sp.</i>	"
	mk11429	AF454582	Kilpisjärvi, Finlandia	<i>Betula sp.</i>	"
	O73610	GU234155	Svalbard, Noruega	<i>Betula nana</i>	Geml <i>et al.</i> , 2012
<i>L. scabrum</i>	hdb053	AF454585	Hoogeveen, Holanda	¿?	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
	hdb022	AF454583	Borgsjö, Suecia	¿?	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
<i>L. talamancae</i>	halling8001	AY544779	San Gerardo, Costa Rica	<i>Quercus sp.</i>	den Bakker <i>et al.</i> , 2004b
<i>L. variicolor</i>	Hdb007	AF454570	Östavall, Suecia	¿?	"
<i>L. versipelle</i>	OF64036	AF454574	Lærdal, Noruega	<i>Arctostaphylos sp.</i>	den Bakker <i>et al.</i> , 2004a
<i>L. vulpinum</i>	TRTC156468	JN021054	Quevec, Canada	¿?	Dentinger <i>et al.</i> , 2011
	hdb92	AF454580	Sogndal, Noruega	<i>Pinus sp.</i>	den Bakker <i>et al.</i> , 2004b
Grupo externo					
<i>Boletus edulis</i>	LCG184	AF074921	Oregon, EEUU	¿?	Grubisha <i>et al.</i> , 2002

<i>Paxillus</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>P. ammoniavirescens</i>	IB1997_0980	JN661718	Medio Campidano, Cerdeña, Italia	¿?	Vellinga <i>et al.</i> , 2012
	A.E. Hills 2007045 (K)	JN661717	Esterel-Les Espagnols, Francia	<i>Quercus suber</i> <i>Populus sp.</i>	"
	A.E. Hills 2004209 (K)	JN661711	Kent, Inglaterra	¿?	"
	A.E. Hills 2005059 (K)	JN661713	Hampshire, Inglaterra	<i>Salix caprea</i>	"
	A.E. Hills 2007039 (K)	JN661715	Esterel-Les Espagnols, Francia	<i>Alnus sp.</i>	"
	M. Contu (UC)	JN661719	Olbia-Tempio, Cerdeña, Italia	<i>Populus sp.</i>	"
	TENN:60947	JN673717	Fiordland, Nueva Zelanda	¿?	Hughes <i>et al.</i> , 2011 Sin publicar
	Auz08.15	KF261362	Auzeville-Tolosane, Francia	<i>Betula sp.</i> <i>Pinus sp.</i> <i>Alnus sp.</i>	Jargeat <i>et al.</i> , 2014
	Eau11.2	KF261385	Eauze, Francia	<i>Salix sp.</i>	"
	Lou11.1	KF261388	Loubersan, Francia	<i>Quercus sp.</i>	"
	Pou09.1	KF261395	Pouvourville, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Cer09.15	KF261383	Ceret, Francia	<i>Populus sp.</i> <i>Alnus sp.</i>	"
	Ram10.1	KF261397	Ramonville-Saint-Agne, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Ram10.3	KF261399	Ramonville-Saint-Agne, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Ram10.2	KF261398	Ramonville-Saint-Agne, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Ram11.2	KF261400	Ramonville-Saint-Agne, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Tou08.5	KF261414	Toulouse, Francia	<i>Pinus sp.</i>	"
	Tou08.C	KF261415	Toulouse, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	ALB08.4	KF482483	Amelie-les-Bains, Francia	<i>Populus sp.</i> <i>Alnus sp.</i>	"
	Sau12.4	KF261408	Saurat, Francia	<i>Abies sp.</i>	"
	Tou11.7	KF261417	Toulouse, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Tou11.8	KF261418	Toulouse, Francia	<i>Cedrus sp.</i>	"
	Tou12.1	KF261420	Toulouse, Francia	<i>Populus sp.</i>	"
A.E. Hills 2005047 (K)	JN661712	Berkshire, Inglaterra	<i>Quercus robur</i>	Vellinga <i>et al.</i> , 2012	
A.E. Hills 2005086 (K)	JN661714	Oxfordshire, Inglaterra	<i>Tilia cordata</i>	"	
Tou11.1	KF261416	Toulouse, Francia	<i>Populus sp.</i>	Jargeat <i>et al.</i> , 2014	
<i>P. cuprinus</i>	Arf12.8	KF261360	Arfons, Francia	¿?	"
	Can12.3	KF261370	Cantaous, Francia	<i>Corylus sp.</i>	"
	Car10.1	KF261371	Cantaous, Francia	¿?	"
	Cas09.1	KF261377	Castanet-Tolosan, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Cas09.3	KF261378	Castanet-Tolosan, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Cas12.4	KF261381	Castanet-Tolosan, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Cas12.5	KF261382	Castanet-Tolosan, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Cas10.3	KF261379	Castanet-Tolosan, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Eau11.1	KF261384	Eauze, Francia	<i>Alnus sp.</i> <i>Salix sp.</i>	"
	Lil12.1	KF261387	Lille, Francia	<i>Chamaeyparis sp.</i> <i>Betula sp.</i>	"
	PM10.A1	KF261389	Prats-de-Mollo, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	PM10.A2	KF261390	Prats-de-Mollo, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	PM10.A4	KF261391	Prats-de-Mollo, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Sau10.3	KF261404	Saurat, Francia	<i>Betula sp.</i> <i>Alnus sp.</i> <i>Pinus sp.</i>	"
	PM10.C1	KF261392	Prats-de-Mollo, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	SVB08.2	KF261412	Saint-Vincent-en-Bresse, Francia	<i>Betula sp.</i>	"
	Tou02.1	KF261413	Toulouse, Francia	<i>Corylus sp.</i>	"
	Tou11.9	KF261419	Toulouse, Francia	<i>Cedrus sp.</i> <i>Betula sp.</i> <i>Ostrya sp.</i>	"
	Ve12.1	KF261422	Reggio nell'Emilia, Italia	<i>Quercus sp.</i> <i>Castanea sp.</i>	"
	<i>P. involutus</i>	DGC-4(2)	AY230243	Devon, Inglaterra	¿?
TENN:61405		JN673722	Tennessee, EEUU	¿?	Hughes <i>et al.</i> , 2011 Sin publicar
TENN:62154		JN673723	Tennessee, EEUU	¿?	"
EW15		FR750011	Alemania	¿?	Yurkov <i>et al.</i> , 2012
JMP0052		EU819416	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer <i>et al.</i> , 2008
PiURL2		EU488709	¿?	¿?	Mitchell <i>et al.</i> , 2008

	PIIRL3	EU488708	¿?	¿?	Sin publicar
	B 08	EU346876	¿?	¿?	Naumann <i>et al.</i> , 2007
	PI5BE	EU078740	Bélgica	¿?	Sin publicar
	CBS 477.89	EU078737	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Hedh <i>et al.</i> , 2008
	SE05091403	EU078735	Småland, Suecia	<i>Betula sp.</i>	"
	SE05091402	EU078734	Småland, Suecia	<i>Picea sp.</i>	"
	PI9SE	EU078733	Skåne, Suecia	<i>Pinus sp.</i>	"
	KBE02065	EU078732	Skåne, Suecia	<i>Betula sp.</i>	"
	KBE02053	EU078730	Skåne, Suecia	<i>Picea sp.</i>	"
	Pi11SE	EU078727	Skåne, Suecia	<i>Quercus sp.</i>	"
	Can (LH-145-03)	EU078721	Ontario, Canadá	<i>Fraxinus sp.</i>	"
	SE04091102	EU078720	Halland, Suecia	<i>Betula sp.</i>	"
	SR788	AJ438984	Thalhausen, Alemania	<i>Picea alies</i>	Schubert <i>et al.</i> , 2003
	PIIRL1	EU488707	¿?	¿?	Mitchell <i>et al.</i> , 2008
	PI08BE	AY585919	¿?	¿?	Sin publicar
	PAX	KF482483	Portugal	<i>Pinus sp.</i>	Rajashekar, 2004
	PI01SE	AY585918	¿?	¿?	Sin publicar
	UBC F16285	EU486436	Canadá	¿?	Franco <i>et al.</i> , 2013
	PIG05	DQ179126	Uppsala, Canadá	¿?	Sin publicar
	OUC99185	DQ367909	Columbia Británica, Canadá	¿?	Rajashekar, 2004
	JS06-7	JN021066	Ontario, Canadá	¿?	Sin publicar
<i>P. obscurosporus</i>	CH 290_98	EU084665	Baviera, Alemania	<i>Tilia sp.</i>	Durall <i>et al.</i> , 2006
<i>P. vernalis</i>	M. Kuo 09120701 (UC)	JN661720	Miami, EEUU	¿?	Dentinger <i>et al.</i> 2011
Grupo externo					
<i>P. rubicundulus</i>	Orton_2905	EU084667	Escocia	¿?	Vellinga <i>et al.</i> , 2012

<i>Scleroderma</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>S. areolatum</i>	JMP0080	EU819438	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer <i>et al.</i> , 2008
<i>S. auranticum</i>	8-5	HM237174	Sichuan, China	<i>Eucalyptus grandis</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>S. bermudense</i>	BZ3961	EU718118	¿?	¿?	Wilson <i>et al.</i> , 2008 Sin Publicar
<i>S. bovista</i>	HE21021	KC505549	¿?	¿?	Sun <i>et al.</i> , 2013 Sin publicar
	125	JN182900	Sichuan, China	¿?	He <i>et al.</i> , 2014 Sin publicar
	HE21029	KC505551	¿?	¿?	Sun <i>et al.</i> , 2013 Sin publicar
		AB099901	Monte Fuji, Japón	<i>Pinus kesiya</i>	Kanchanaprayudh <i>et al.</i> , 2003
	K80S09	GQ267487	Nueva Zelanda	<i>Pinus radiata</i>	Walbert <i>et al.</i> , 2010
	Nara_ScB84e3	AB211267	Shizuoka, Japón	<i>Salix reinii</i>	Nara, 2006
	O1A1	JX030276	Syracuse, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Tourtellot, 2013
	Scl_1-2-2LC2	JX030218	Syracuse, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	"
	RT00034	EU819517	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer <i>et al.</i> , 2008
	O1Q1	JX030277	Syracuse, EEUU	<i>Castanea mollissima</i>	Tourtellot, 2013
	Scl_1-1-2LC	JX030217	Syracuse, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	"
	RBG Kew K(M)105588	EU784409	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009
	09MCF11184	HF933242	Leskovac, Serbia	¿?	Rusevska <i>et al.</i> , 2014
	05MCF788	HF933235	Kozhuf, Macedonia	<i>Fagus sp.</i>	"
	MG061001_01	JQ669943	Thuringia, Alemania	¿?	Gube y Dörfelt, 2011
	RBG Kew K(M)106958	EU784410	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009
	<i>S. cepa</i>	06MCF5993	HF933240	Skopska, Macedonia	<i>Quercus sp.</i> <i>Castanea sp</i>
01MCF168		HF933234	Pelister, Macedonia	<i>Abieti-Fagetum</i>	"
<i>S. citrinum</i>	05MCF5304	HF933236	Jablanica, Macedonia	<i>Fagus sp.</i>	"
	BOVSCL1	FM213340	Cataluña, España	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2009
<i>S. cepa</i>	RBG Kew K(M)54373	EU784412	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009
<i>S. citrinum</i>	ecmSC2	JX679368	Republica checa	<i>Quercus sp.</i>	Kavkova, 2012 Sin publicar
	UNSCl_3 (SCL5)	FM213334	Dawyck, Escocia	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2009
	UNSCl_2 (SCL3)	FM213333	Dawyck, Escocia	¿?	"
	UNSCl_4 (SCL7)	FM213335	Dawyck, Escocia	¿?	"
	Scl_2-2-1H	JX030205	Nueva York, EEUU	<i>Tsuga canadensis</i>	Tourtellot, 2012 Sin publicar
	CITSCL_2	FM213345	Wisconsin, EEUU	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2009
	Scl_2-2-1HC	JX030207	Nueva York, EEUU	<i>Tsuga canadensis</i>	Tourtellot, 2012 Sin publicar
	CITSCL_1	FM213344	Wisconsin, EEUU	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2009
	Scl_1-3-1H	JX030202	Nueva York, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Tourtellot, 2012 Sin publicar
	BB28	HM189957	¿?	<i>Fagus sylvatica</i>	Bubner y Muenzenberger, 2010 Sin publicar
		FJ824090	Ohio, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Bauman, 2010
	RBG Kew K(M)53906	EU784414	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009
	AWW212	EU718119	Norte America	¿?	Wilson <i>et al.</i> , 2012
RBG Kew K(M)17485	EU784413	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009	
F:PRL5772	GQ166907	Indiana, EEUU	<i>Quercus sp.</i>	Avis <i>et al.</i> , 2009 Sin publicar	
<i>S. columnare</i>	KHS3	AB459512	Chachoengsao, Tailandia	<i>Dipterocarpus alatus</i>	Yomyart <i>et al.</i> , 2008 Sin publicar
<i>S. dictyosporum</i>	IR109	FJ840442	Burkina Faso	<i>Azelia africana</i>	Sanon <i>et al.</i> , 2009
<i>S. meridionale</i>	05MCF5505	HF933239	Bogdanci, Macedonia	<i>Carpinetum orientalis</i>	Rusevska <i>et al.</i> , 2014
<i>S. michiganense</i>	E00278311	EU819441	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer <i>et al.</i> , 2008
<i>S. patagonicum</i>	Trappe 26236 (CORD)	HQ688788	Argentina	¿?	Nouhra <i>et al.</i> , 2012
<i>S. polyrhizum</i>	E00278315	FM213349	Wisconsin, EEUU	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2009
<i>S. septentrionale</i>	SEPSCL3	FM213338	Wisconsin, EEUU	¿?	"
<i>S. sinnamariense</i>	SINSCL9	FM213364	Muang, Tailandia	¿?	"
<i>S. verrucosum</i>	RBG Kew K(M)30670	EU784415	¿?	¿?	Brock <i>et al.</i> , 2009
<i>S. xanthochroum</i>	AWW254	EU718126	Sudeste asiatico	¿?	Wilson <i>et al.</i> , 2012
<i>S. yunnanense</i>	Ji001A	JQ639040	Yunnan, China	<i>Pinus kesiya</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Grupo externo					
<i>Astraeus odoratus</i>	ASTRAE-58	AJ629874	Roi Et, Tailandia	¿?	Phosri <i>et al.</i> , 2007

<i>Tricholoma</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>T. albobrunneum</i>	CBS 572.96	AF241520	Holanda	<i>Pinus sylvestris</i>	Suh y Kim, 2000 Sin publicar
<i>T. alboconicum</i>	JHC95.072	HQ184099	Suecia	<i>Betula sp.</i>	Jargeat <i>et al.</i> , 2010
<i>T. argyraceum</i>	CBS 361.47	AF062612	Francia	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998
<i>T. atrosquamosum</i>	KMS435	AF349701	California, EEUU	¿?	Bidartondo y Bruns, 2001
<i>T. aurantium</i>	LCG2308	JN019587	Canadá	<i>Populus sp.</i>	Grubisha <i>et al.</i> , 2012
<i>T. batschii</i>	GK 2628	AF062627	¿?	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998
<i>T. cingulatum</i>	Wim83.1	GU060264	Wimereux, Francia	<i>Salix sp</i>	Jargeat <i>et al.</i> , 2010
	SCV03.1	GU060263	Ste-Croix-Volvestre, Francia	<i>Salix caprea</i>	"
	Rim03.1	GU060262	Rimont Ariège, Francia	<i>Salix caprea</i>	"
	Mer06.1	HQ184137	Merlimont, Francia	<i>Salix repens</i>	"
	SCV07.1	HQ184136	Ste-Croix-Volvestre, Francia	<i>Salix caprea</i>	"
	FM06.1	HQ184135	Flines-les-Montagnes Nord, Francia	<i>Salix sp</i>	"
	MC96170	HQ184100	Dinamarca	<i>Salix sp</i>	"
	N95210	AF349697	Holanda	¿?	Bidartondo y Bruns, 2001
	HDT38137	AF377198	California, EEUU	<i>Salix sp.</i>	Bidartondo y Bruns, 2002
	CB8966	AF377197	California, EEUU	<i>Salix sp.</i>	"
<i>T. fulvum</i>	F17082	FJ717488	Canadá	¿?	Harrower <i>et al.</i> , 2009 Sin publicar
	Trifu2III	AY573543	¿?	¿?	Krause y Kothe, 2004 Sin publicar
	UP602	EF493258	Uppsala, Suecia	Bosque mixto	Nygren <i>et al.</i> , 2008
	UP88	DQ658855	Uppsala, Suecia	Bosque mixto	Nygren <i>et al.</i> , 2007
<i>T. orirubens</i>	KR 6913	AF062610	¿?	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998
<i>T. pessundatum</i>	DAVFP:27568	JF899576	Columbia Británica, Canadá	<i>Tsuga heterophylla</i>	Guichon <i>et al.</i> , 2011 Sin publicar
<i>T. populinum</i>	LCG2308	JN019587	Canadá	<i>Populus sp.</i>	Grubisha <i>et al.</i> , 2012
<i>T. scalpturatum</i>	GK	AF062624	¿?	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998
<i>T. stans</i>	17133	JF908733	Finlandia	¿?	Osmundson <i>et al.</i> , 2013
<i>T. terreum</i>	CBS 370.47	AF062618	Holanda	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998
<i>T. ustale</i>	Tu 1	AF204812	Hino, Japón	<i>Pinus densifolia</i>	Kikuchi <i>et al.</i> , 2000
<i>T. ustaloides</i>	KMS324	AF377240	California, EEUU	¿?	Bidartondo y Bruns, 2002
Grupo externo					
<i>Schizophyllum commune</i>	CBS 340.81	AF062633	¿?	¿?	Mankel <i>et al.</i> , 1998

Helotiales					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>Aquapoterium pinicola</i>	ATCC MYA-4213	FJ172275	Florida, EEUU	Agujas de pino	Raja <i>et al.</i> , 2008
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Bbleafspot	EU676263	China	Hojas de arándano	Shang <i>et al.</i> , 2008 Sin publicar
<i>Bryoglossum gracile</i>	DAOM178087	AY789285	¿?	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Cadophora finlandia</i>	FAG 15	AF011327	Alberta, Canadá	<i>Pinus sylvestris</i>	Saenz y Taylor, 1999
<i>Cistella acuum</i>	JHH3966 NYS	U57492	EEUU	¿?	Cantrell y Hanlin, 1997
<i>Crocicreas amenti</i>	HB:6884	FJ005094	Tübingen, Alemania	<i>Salix caprea</i>	Platas <i>et al.</i> , 2008 Sin publicar
<i>Crocicreas coronatum</i>	CBS 197.62	FJ005106	Lyon, Francia	¿?	"
<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	BCW-42-126d	EF413591	Alberta, Canada	<i>Populus tremuloide</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Cudoniella clavus</i>	ILLS:60488	JQ256415	EEUU	¿?	Hustad <i>et al.</i> , 2011
<i>Dactylaria dimorphospora</i>	CCRC 32916	U51980	Holanda	Suelo agricola	Liou y Tzean, 1997
<i>Dermea acerina</i>	CBS161.38	AF141164	Ontario, Canadá	<i>Acer rubrum</i>	Abeln <i>et al.</i> , 2000
<i>Encoelia fascicularis</i>	2153.H	Z81431	Telemark, Noruega	<i>Populus tremula</i>	Holst-Jensen <i>et al.</i> , 1998
<i>Heyderia abietis</i>	HMAS71954	AY789297	China	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Hyalodendriella betulae</i>	CBS 261.82	EU040232	Holanda	<i>Alnus glutinosa</i>	Crous <i>et al.</i> , 2007
<i>Hyaloscypha aureliella</i>		U57495	EEUU	¿?	Cantrell y Hanlin, 1997
<i>Hyaloscypha daedaleae</i>	ZW-Geo138-Clark	AY789416	¿?	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Hymenoscyphus fructigenus</i>	ARON3264.H.	AJ430396	Noruega	<i>Quercus robur</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Hymenoscyphus monotropae</i>	ATCC52305	AF169309	EEUU	<i>Monotropa uniflora</i>	Bills <i>et al.</i> , 1999
<i>Hymenoscyphus rhodoleucus</i>	ARON2329.P.	AJ430395	Noruega	<i>Equisetum sp.</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Hymenoscyphus scutula</i>	MBH29259	AY789432	¿?	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypodiscus hymenophilus</i>	CBS 886.73	DQ227263	Holanda	<i>Piptoporus betulinus</i>	Untereiner <i>et al.</i> , 2006
<i>Lambertella tubulosa</i>	ICMP:14615	EF029195	Nueva Zelanda	<i>Nothofagus solandri</i>	Cooper <i>et al.</i> , 2006 Sin publicar
<i>Lachnellula calyciformis</i>	JHH 4622 NYS	U59145	EEUU	¿?	Cantrell y Hanlin, 1997
<i>Lachnum bicolor</i>	ARON3113	AJ430394	Noruega	Ramas en pudrición	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Lachnum clandestinum</i>	JHH4676 NYS	U58636	EEUU	¿?	Cantrell y Hanlin, 1997
<i>Lachnum controversum</i>	JHH4611 NYS	U58638	EEUU	¿?	"
<i>Lachnum pygmaeum</i>	ARON3248.P.	AJ430218	Noruega	<i>Picea abies</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Lachnum rhytmatis</i>	ARON3186.H	AJ430220	Noruega	<i>Vaccinium myrtillus</i>	"
<i>Lachnum virgineum</i>	ARON3137.P.	AJ430221	Noruega	<i>Epilobium angustifolium</i>	"
<i>Leotia heterochroma</i>	21ME	AY144561	EEUU	¿?	Zhong y Pfister, 2004
<i>Meliniomyces bicolor</i>	ARON2805	AJ430147	North Yorkshire, Inglaterra	<i>Nothofagus procera</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Meliniomyces variabilis</i>	UAMH 10029	AY838793	Canadá	<i>Cypripedium acaule</i>	Hambleton y Sigler, 2005
<i>Meliniomyces vraolstadae</i>	ARON2916.S	AJ292199	Noruega	<i>Betula pubescens</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b
<i>Meria laricis</i>		U92298	EEUU	<i>Larix occidentalis</i>	Gernandt <i>et al.</i> , 1997
<i>Mitrulea paludosa</i>	MBH50636	AY789424	¿?	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Mollisia cinerea</i>	ARON3129.P.	AJ430222	Noruega	<i>Picea Abies</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Monilia fructicola</i>	2651	AB125617	Hirosaki, Japón	<i>Prunus avium</i>	Harada <i>et al.</i> , 2004
<i>Neobulgaria pura</i>	KACC:45619	JN033385	EEUU	Ascocarpo sobre musgo	Han <i>et al.</i> , 2014
<i>Neocudoniella radicea</i>	UAMH 5794	AY524843	Ontario, Canadá	<i>Picea mariana</i>	Wilson <i>et al.</i> , 2004
<i>Neofabrea malicorticis</i>	CBS 141.22	AF141161	Holanda	Fruto de <i>Malus sylvestris</i>	Abeln <i>et al.</i> , 2000
<i>Ombrophila violacea</i>	WZ0024	AY789366	Shichuan, China	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Pezicula heterochroma</i>	CBS 199.46	AF141167	Nueva escocia, Canda	<i>Alnus crispa</i> var. <i>mollis</i>	Abeln <i>et al.</i> , 2000
<i>Pezicula sporulosa</i>	CBS 224.96	AF141172	Holanda	Ramas de <i>Larix decidua</i>	"
<i>Phacidium infestans</i>		U92305	EEUU	<i>Pinus cebra</i>	Gernandt <i>et al.</i> , 1997
<i>Phialocephala fortinii</i>	UAMH9525	AF214579	Alberta, Canada	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Addy <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrenopeziza revincta</i>	ARON3150.P.	AJ430224	Noruega	<i>Epilobium angustifolium</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Rhabdocline parkeri</i>		U92294	EEUU	<i>Pseudotsuda menziesii</i>	Gernandt <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhabdocline pseudotsugae</i>		U92290	EEUU	<i>Pseudotsuda menziesii</i>	"
<i>Rhizoscyphus ericae</i>	UAMH 6735	AY762620	Inglaterra	<i>Calluna vulgaris</i>	Hambleton y Sigler, 2005
<i>Roesleria subterranea</i>	CBS 339.96	EF060308	Austria	Ramas de un arbusto	Kirchmair <i>et al.</i> , 2008
<i>Scleromitrella shiraiana</i>	Hirayama062001	AY789408	¿?	¿?	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	LMK44	Z73800	Ontario, Canadá	<i>Lactuca sp.</i>	Holst-Jensen <i>et al.</i> , 1997
<i>Scytalidium lignicola</i>	UAMH 1502	AY762623	Italia	¿?	Hambleton y Sigler, 2005
<i>Tapesia cinerella</i>	ARON3188.H.	AJ430228	Noruega	Ascocarpo sobre ramas	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
<i>Tapesia fusca</i>	ARON3154.H.	AJ430229	Noruega	Ascocarpo sobre ramas	"
<i>Torrendiella eucalypti</i>	CPC 11051	DQ195789	Indonesia	<i>Eucalyptus sp.</i>	Crous <i>et al.</i> , 2006
<i>Trimmatostroma betulinum</i>	CBS 282.74	EU019299	Holanda	Ramas <i>Betula verrucosa</i>	Crous <i>et al.</i> , 2007
<i>Trimmatostroma salicis</i>	CPC 13571	EU019300	Alemania	<i>Salix alba</i>	"
<i>Vibrissea flavovirens</i>	ICMP:19442	KF429257	Nueva Zelanda	¿?	Johnston y Park, 2013 Sin publicar
<i>Vibrissea truncorum</i>		JX415337	Oregon, EEUU	¿?	Frank, 2012 Sin publicar
Grupo externo					
<i>Bulgaria inquinans</i>	CBS 315.71	JN033386	Suiza	<i>Quercus robur</i>	Han <i>et al.</i> , 2014

Familias Hyalocyphaceae-Heloticeae					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>Bisporella citrina</i>	F118000	KC412005	León, España	<i>Quercus robur</i>	Baral <i>et al.</i> , 2013
	ICMP:169977	GQ411507	Anterbury, Nueva Zelanda	<i>Nothofagus solandri</i>	Fukami <i>et al.</i> , 2009
	Andy 9/27/03	AY789386	Nueva York, EEUU	<i>Fagus americana</i>	Wang <i>et al.</i> , 2005
	F14046 (UBC)	AF335454	Columbia Británica, Canadá	¿?	Berbee <i>et al.</i> , 2001
	ILLS:61033	JQ256414	Illinois, EEUU	¿?	Sin publicar
<i>Calycina herbarum</i>	KUS-F51458	JN033390	Jinju, Corea	<i>Boehmeria</i> sp.	Han <i>et al.</i> , 2014
	1549	AY348594	China	¿?	Zhang y Zhuang, 2004
	KUS-F52362	JN033407	Wonju, Corea	Tallos herbáceos	Han <i>et al.</i> , 2014
	NBRC 9520	AB705231	Lyon, Francia	¿?	Zhao <i>et al.</i> , 2012
<i>Calycellina populina</i>	CBS:247.62	JN033382	Lyon, Francia	¿?	Han <i>et al.</i> , 2014
<i>Hyaloscypha vitreola</i>	CBS:127.91	JN033378	Kaarina, Finlandia	<i>Sorbus aucuparia</i>	"
	WA0000019123	JX981495	Polonia	¿?	Pawlowska y Wrzosek, 2012
	M236	EU940232	Laukka, Finlandia	Briofitos	Sin publicar
	M39	EU940231	Finlandia	Briofitos	Baral <i>et al.</i> , 2009
	M39	JN943613	South Häme, Finlandia	Madera podrida	"
	M220	FJ477059	Huhtinen, Finlandia	¿?	Schoch <i>et al.</i> , 2012
<i>Chalara pseudoaffinis</i>	CCF:3979	FR667224	Republica Checa	<i>Pinus sylvestris</i>	Baral <i>et al.</i> , 2009
<i>Pezizella discreta</i>	7511	JF908571	Italia	¿?	Koukol, 2011
Secuencias no identificadas					
uncultured Helotiaceae	ECM18(64)	GQ985426	China	<i>Pinus tabulaeformis</i>	Wang y Guo, 2010
uncultured Ascomycota	5	AY833032	Essonne, Francia	<i>Cephalanthera damasonium</i>	Julou <i>et al.</i> , 2005
uncultured Helotiales	LP110074	JQ318662	China	<i>Quercus liaotungensis</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2014
uncultured Helotiales	4	DQ182433	¿?	<i>Cephalanthera longifolia</i>	Selosse, 2005
uncultured <i>Phialophora</i>	I	AY578277	California, EEUU	<i>Cypripedium montanum</i>	Sin publicar
<i>Helotiales</i> sp	O_1_LILB_26_5d	KC007304	EEUU	<i>Populus trichocarpa</i>	Shefferson <i>et al.</i> , 2005
uncultured fungus	OTU67-R-66-p14-VNQM-b	JF927113	Leonessa, Italia	<i>Quercus pubescens</i>	Bonito <i>et al.</i> , 2012
uncultured fungus	CG3D	JQ723324	Toscana, Italia	<i>Orchis pauciflora</i>	Sin publicar
Grupo externo					
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	LMK44	Z73800	Ontario, Canadá	<i>Lactuca</i> sp.	Pecoraro <i>et al.</i> , 2011
					Holst-Jensen <i>et al.</i> , 1997

Complejo <i>Meliniomyces-Rhizoscyphus</i>					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación Geográfica	Hospedador	Autor
<i>Cadophora finlandia</i>	KRP24-5	HM036584	Lituania	<i>Pinus sylvestris</i>	Menkis y Vasaitis, 2011
	aurim603	AY606311	Lituania	<i>Picea abies</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2004
	aurim620	DQ069045	Lituania	<i>Pinus sylvestris</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2005
	Sml36B	HQ406816	Lituania	<i>Pinus sylvestris</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2012
	X5	KF850368	China	<i>Pinus tabuliformis</i>	Xu <i>et al.</i> , 2013 Sin publicar
	IFM 5053	AB190393	¿?	¿?	Fukushima <i>et al.</i> , 2004 Sin publicar
	Hy15	GU550108	Finlandia	<i>Picea abies</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2010
	CFI-3	EF093179	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Vohnik <i>et al.</i> , 2006 Sin publicar
	NS30A	DQ320128	Lituania	<i>Picea abies</i>	Vasiliauskas <i>et al.</i> , 2007
	NS73A	DQ068992	Lituania	<i>Pinus yilvestris</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2005
<i>Meliniomyces bicolor</i>	ARON2906.S.	AJ308341	Noruega	<i>Picea abies</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b
	ARON2810.S	AJ308340	Noruega	<i>Picea abies</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b
	BB60_108	HM190124	¿?	<i>Pinus sylvestris</i>	Bubner y Muenzenberger, 2010 Sin publicar
	E	FN179335	Aberdeenshire, Inglaterra	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2009
	CGI1	EF517302	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Soukupová <i>et al.</i> , 2008
	ARSL 190907.74	HQ157880	Nueva Escocia, Canadá	<i>Abies balsamifera</i>	Kernaghan y Patriquin, 2011
	ARSL 180907.22	HQ157926	Nueva Escocia, Canadá	<i>Picea glauca</i>	"
	ARON2805	NR111112	North Yorkshire, Inglaterra	<i>Nothofagus procera</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a
	FG54P1c	FN678888	Escocia	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2010
ARON2805	AJ430147	North Yorkshire, Inglaterra	<i>Nothofagus procera</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002a	
<i>Meliniomyces variabilis</i>	UAMH 5900	AY838783	Ontario, Canada	<i>Picea mariana</i>	Hambleton y Sigler, 2005
	MVA-9	EF093173	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Vohnik <i>et al.</i> , 2013
	MVA-12	EF093178	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	"
	MVA-8	EF093172	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	"
	TE2	HQ856903	Finlandia	<i>Trientalis europaea</i>	Tejesvi <i>et al.</i> , 2013
	GT6P1	FN678881	Escocia	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2010
	J3	JQ088277	¿?	<i>Rhododendron dauricum</i>	Yang y Yan, 2011 Sin publicar
	BB23_106	HM190125	¿?	<i>Pinus sylvestris</i>	Bubner y Muenzenberger, 2010 Sin publicar
	AM6BB9F5	JQ272408	Nantahala, EEUU	<i>Rhododendron sp.</i>	Baird <i>et al.</i> , 2014
	CCF 3583	AM261523	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Vohnik <i>et al.</i> , 2007
	UAMH 6827	AY838786	Irlanda	<i>Picea sitchensis</i>	Hambleton y Sigler, 2005
	MVA-2	AM261524	Republica Checa	Ascocarpo de <i>Hydnotrya tulasnei</i>	Vohnik <i>et al.</i> , 2007
	GT7P1	FN678872	Escocia	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2010
	ARSL 230507.7	HQ157843	Nueva Escocia, Canadá	<i>Betula papyrifera</i>	Kernaghan y Patriquin, 2011
	GF6P1a	FN678873	Escocia	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2010
	C1	KF156311	Suecia	<i>Picea abies</i>	Stenstrom <i>et al.</i> , 2014
	MVA-11	EF093177	Republica Checa	<i>Picea abies</i>	Vohnik <i>et al.</i> , 2013
ARSL 230507.30I 2412	HQ157844 KC480048	Nueva Escocia, Canadá Finlandia	<i>papyrifera</i> <i>Picea abies</i>	Kernaghan y Patriquin, 2011 Terhonen <i>et al.</i> , 2014	
<i>Meliniomyces vraalstadiae</i>	ARON2917.S	AJ292200	Noruega	<i>Betula pubescens</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b
	FG34P1	FN678887	Escocia	<i>Pinus sylvestris</i>	Grelet <i>et al.</i> , 2010
	ARSL 170507.36	HQ157883	Nueva Escocia, Canadá	<i>Abies balsamifera</i>	Kernaghan y Patriquin, 2011
	ARSL 250507.3	HQ157841	Nueva Escocia, Canadá	<i>Betula papyrifera</i>	"
	ARSL 230507.6	HQ157842	Nueva Escocia, Canadá	<i>Betula papyrifera</i>	"
	ARSL 170507.42I	HQ157884	Nueva Escocia, Canadá	<i>Abies balsamifera</i>	"
ARON2916.S	AJ292199	Noruega	<i>Betula pubescens</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b	
<i>Rhizoscyphus ericae</i>	aurim1186	DQ093679	Lituania	<i>Picea abies</i>	Menkis <i>et al.</i> , 2006
		HQ873698	Canada	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Gorzela <i>et al.</i> , 2012
	UBCtra141	AF149067	Vancouver, Canada	<i>Gaultheria shallon</i>	Allen <i>et al.</i> , 2003
	UBCtra241	AF149068	Vancouver, Canada	<i>Gaultheria shallon</i>	"
	Cv_StP_G11	EF658757	Antartida, Argentina	<i>Cephalozia varians</i>	Upson <i>et al.</i> , 2007
	Vm_PoC_S14	EF658750	Antartida, Argentina	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	"
	UBCtra274	AF149069	Vancouver, Canada	<i>Gaultheria shallon</i>	Allen <i>et al.</i> , 2003
	UAMH 8680	AY762622	Athabasca, Canada	<i>Ledum groenlandicum</i>	Hambleton y Sigler, 2005
	Cv_RoP_D5	EF658743	Vancouver, Canada	<i>Gaultheria shallon</i>	Allen <i>et al.</i> , 2003
		EU221877	Tierra de Fuego, Chile	<i>Pachyschistochila splachnophylla</i>	Pressel <i>et al.</i> , 2008
	11	AM887700	Sao Domingos, Portugal	<i>Erica andevalensis</i>	Turnau <i>et al.</i> , 2007
	UAMH 6735I	NR111110	Inglaterra	<i>Calluna vulgaris</i>	Vrålstad <i>et al.</i> , 2002b
	UP505	DQ658887	North York Moors, Inglaterra	Sobre suelo glacial húmico	Nyger <i>et al.</i> , 2007
Grupo externo					
<i>Neocudoniella radicella</i>	UAMH 5794	AY524843	Ontario, Canadá	<i>Picea mariana</i>	Wilson <i>et al.</i> , 2004

