

HONGOS EXÓTICOS DE PARQUES NACIONALES ESPAÑOLES

JESÚS DÍEZ^{1,3}, GABRIEL MORENO², ELENA FERNÁNDEZ² Y ANA MURIEL¹

RESUMEN

Se estudió la diversidad de los hongos ectomicorrícicos exóticos existentes en el Parque Nacional de Cabañeros y su posible persistencia después de la erradicación de los eucaliptos y la plantación de encinas y alcornoques. Para ello se muestrean raíces y suelo, donde hay o hubo eucaliptos. También analizamos si alguno de estos hongos exóticos coloniza alguna de las formaciones vegetales del parque. Además estudiamos la comunidad fúngica que coloniza las raíces de encinas y alcornoques plantados en una zona próxima al P. N. de Monfragüe, donde los eucaliptos habían sido previamente eliminados. Para la identificación de los simbiontes fúngico y vegetal que forman las ectomicorrizas y los micelios edáficos, se emplearon los métodos moleculares T-RFLP y la secuenciación de las regiones ITS del rDNA nuclear.

En Cabañeros detectamos once especies fúngicas australianas en las raíces de eucaliptos. Muchos de ellas, por ejemplo *Laccaria fraterna* (Cooke & Mass) Pegl., *Setchelliogaster rheophyllus* (Ber. & Malenç.) G. Moreno, *Hydnangium carneum* Wallr., llegan a fructificar abundantemente bajo los eucaliptos. Sin embargo, en la vegetación ectomicorrícica natural del parque no hemos encontrado hongos australianos, a excepción de *Laccaria fraterna*, que formaba ectomicorrizas en las raíces de jaras (*Cistus*). Por otra parte, no encontramos hongos exóticos en las raíces de los árboles nativos plantados en antiguas plantaciones de eucalipto. Nuestro trabajo muestra la persistencia de una rica comunidad fúngica de hongos australianos en los eucaliptos del P. N. de Cabañeros. Además muestra que los simbiontes fúngicos australianos desaparecen tras la eliminación de los eucaliptos, salvo *Laccaria fraterna*. Este hongo australiano forma ectomicorrizas con la especie nativa *Cistus ladanifer*, sugiriendo que las jaras también podrían hospedar otros hongos australianos.

Palabras clave: micorrizas, eucalipto, hongos, diversidad genética.

SUMMARY

This report describes the research project 77/2003. This project studied the diversity of the ectomycorrhizal communities of eucalypts living in the National Park of Cabañeros. We have also studied the potential persistence of the exotic ectomycorrhizal fungi on the planted native forest tree seedlings after the eucalypt eradication. We sampled plant roots in the N. P. of Cabañeros and on locations where there are, or there were eucalypts before; and we searched for exotic fungi on roots of native woody plants. We studied as well the fungal community colonizing cork oaks and elm oaks planted in a former eucalypt plantation. We used molecular markers for the identification of the plant host and fungal symbionts on root tips, and fungal mycelia on soil samples (T-RFLP and DNA sequencing of the ITS of nuclear rDNA).

¹Departamento de Ecología, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, España.

²Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, España.

³Dirección Actual. Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.

In the N. P. of Cabañeros we detected eleven exotic Australian fungal species on the eucalypt roots. Most of them, e.g. *Laccaria fraterna* (Cooke & Mass.) Pegl., *Setchelliogaster rheophyllus* (Ber. & Malenç.) G. Moreno, *Hydnangium carneum* Wallr. fruited in the eucalypt stand. However, we did not detect Australian ectomycorrhizal fungi on the roots of potential native hosts, except from *Laccaria fraterna*, which was found on *Cistus ladanifer* L. roots. In addition, we did not find any exotic fungi on the roots of the native tree seedlings planted in formed eucalypt plantations. Our study proves that a wealthy community of Australian ectomycorrhizal fungi still lives on the eucalypt roots in the N. P. of Cabañeros. In addition, it shows that the exotic fungal symbionts disappeared after the eucalypt eradication, with the exception of *Laccaria fraterna*. This Australian fungus forms ectomycorrhizal symbiosis with the native woody plant *Cistus ladanifer*, suggesting that rockroses might host additional Australian ectomycorrhizal fungi.

Key words. mycorrhiza, eucalypt, fungi, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos son árboles de origen australiano, introducidos en el Mediterráneo para la producción de pasta de papel y madera. El rápido crecimiento de los eucaliptos, incluso en suelos muy pobres, hace que se los prefiera frente otros árboles maderables. Por ello, en los últimos 60 años se realizaron extensas plantaciones de eucalipto en España. Las principales plantaciones se realizaron en Galicia, la Cornisa Cantábrica, el sudoeste de la Península, y Extremadura. Se plantaron más de 500.000 hectáreas. Principalmente se utilizaron las especies *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. y *E. globulus* Labill. Hay grandes extensiones de *E. camaldulensis* en Huelva, Cádiz, Badajoz y Sevilla. Las principales plantaciones de *E. globulus* se encuentran en Asturias, Santander, Galicia y Huelva.

Algunos parques nacionales poseen eucaliptales en su interior. Los eucaliptos son especies exóticas y presentan varios problemas ambientales que aconsejan su eliminación. Sus largas raíces son capaces de perforar hasta alcanzar las capas freáticas más profundas, absorber grandes cantidades de agua, y acentuar la sequía del suelo. Su eliminación no es fácil, debido a su gran capacidad de rebrotar una vez cortados y de competir con éxito frente a la vegetación natural. Esto parece estar relacionado con la diversidad de hongos asociados a sus raíces, que favorecen la movilización de nutrientes minerales y su nutrición mineral (DÍEZ, 2005; VELLINGA *et al.*, 2009). Estos hongos son conocidos como hongos ectomicorrícicos, debido a la formación de una estructura anatómica raíz-hongo, llamada ecto-

micorriza. En las ectomicorrizas se realiza el intercambio de nutrientes entre el hongo y el árbol. El micosimbionte proporciona al árbol minerales y protección contra estreses abióticos (sequía, etc.) y bióticos (patógenos, etc.). Ante la heterogeneidad de las fuentes de nutrientes en el suelo, la nutrición del árbol es asegurada por estos hongos (BUSCOT *et al.*, 2001). Cada hongo ectomicorrícico ofrecería un beneficio diferente al árbol huésped; por ello, los árboles necesitarían asociarse a hongos con diferentes capacidades para la captura de diferentes nutrientes.

El éxito de las plantaciones forestales exóticas depende de la diversidad de hongos ectomicorrícicos que aseguren su nutrición. Por ello, las plantaciones de eucaliptos en zonas carentes de estos hongos (por ejemplo Sudáfrica) fracasaron hasta que se inocularon con hongos ectomicorrícicos (GROVE & LE TACON, 1993). Sin embargo, la mayoría de las plantaciones de eucaliptos en la Península Ibérica tuvieron éxito, sin necesitar la inoculación con hongos ectomicorrícicos. Dos hipótesis podían explicar su éxito.

- (1) La primera hipótesis sostenía la existencia de hongos ectomicorrícicos indígenas compatibles con los árboles introducidos. Un fenómeno que parece favorecer las plantaciones de coníferas americanas en el norte de España (PARLADÉ *et al.*, 1996).
- (2) Sin embargo, y ya que algunos trabajos previos señalaban la presencia de hongos ectomicorrícicos australianos (HONRUBIA, 1984;

GALÁN & MORENO, 1998), existía una segunda hipótesis: el éxito de las plantaciones de eucalipto podría deberse a la co-introducción de hongos ectomicorrícicos australianos.

Para conocer cuál de las dos hipótesis era la correcta, realizamos un proyecto de investigación financiado por la Universidad de Alcalá, en el que estudiamos si los hongos que fructifican en plantaciones de eucaliptos en la Península Ibérica eran nativos o eran de origen australiano; Proyecto UAH-2002/049 ("*Hongos ectomicorrícicos en eucaliptales de la región mediterránea. ¿Hongos indígenas o introducidos?*").

En los eucaliptales que estudiados, encontramos que fructificaban hongos ectomicorrícicos característicos de bosques australianos. Muchas de estas especies eran hongos secotioides y falsas trufas, adaptados a fructificar en el seco clima mediterráneo, que también se da en el suroeste de Australia. Entre ellas se encontraban especies del género *Descolea*, *Hydnangium* y *Hymenogaster*, en las plantaciones de eucaliptos estudiadas (DÍEZ *et al.*, 2002a; DÍEZ, 2005).

En los eucaliptos estudiados no encontramos ningún hongo ectomicorrícico propio del bosque autóctono a excepción de *Pisolithus*. *Pisolithus* es el principal hongos ectomicorrícico utilizado para favorecer el establecimiento y crecimiento de plantaciones forestales. Las fructificaciones de este hongo eran frecuentes tanto en los bosques mediterráneos como en los eucaliptales que estudiamos. Durante mucho tiempo, *Pisolithus* había sido considerado un género monoespecífico, formado por la especie *P. tinctorius*, un "super-hongo" cosmopolita capaz de mejorar la producción forestal en todo el mundo (CAIRNEY, 2002). La presencia de *Pisolithus* en las plantaciones de eucalipto, podía llevar a pensar que los eucaliptos son capaces de asociarse con hongos ectomicorrícicos de origen mediterráneo con amplio rango de huésped.

A finales de los 90, varios trabajos moleculares sugerían la existencia de varias especies crípticas dentro de *Pisolithus*. (ANDERSON *et al.*, 1998; MARTIN *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1999). En el 2000 comenzamos a estudiar la diversidad gené-

tica de *Pisolithus* en el Mediterráneo Occidental (DÍEZ *et al.*, 2001). En el 2002, tras delimitar diversas especies crípticas dentro de *Pisolithus*, pudimos afirmar que las especies de *Pisolithus* encontradas en eucaliptales en Marruecos y la Península Ibérica, pertenecen a las especies de origen australiano *P. albus* (Cooke & Mass.) J.M. Priest y *P. microcarpus* (Cooke & Mass.) Cunn. (MARTIN *et al.*, 2002). A principios de 2003, era ya evidente que la introducción de los eucaliptos había conllevado la introducción también de especies australianas de hongos ectomicorrícicos. Estos hongos habrían favorecido la supervivencia y asilvestración de los eucaliptos, al permitirles competir eficientemente con las especies arbóreas autóctonas (DÍEZ, 2005).

Son muchos los microorganismos beneficiosos que devienen perjudiciales fuera de su área de distribución natural (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996). Que una especie vegetal exótica se asilvestre y devenga invasora, depende de sus simbiosis ectomicorrícicos. Por ello, la introducción de especies exóticas de hongos ectomicorrícicos, puede tener efectos negativos sobre los ecosistemas naturales. En Sudáfrica, por ejemplo, la introducción de hongos ectomicorrícicos holárticos ha facilitado la asilvestración de los pinos (RICHARDSON *et al.*, 2000). De igual manera, la introducción de hongos australianos en la Península Ibérica, supone un riesgo medioambiental, ya que puede favorecer la adaptación de los eucaliptos a las condiciones climato-edáficas de la Península Ibérica. Podría incluso hacerles más competitivos que los árboles nativos. De hecho, en algunas zonas los eucaliptos se han asilvestrado, y son ya un elemento más del paisaje.

Nuestros espacios naturales no han sido ajenos a las plantaciones de eucaliptos. Este es el caso del Parque Nacional de Cabañeros, del P. N. de Monfragüe, y el P. N. de Doñana. La recuperación de los ecosistemas naturales en estos parques, pasa por la sustitución de los eucaliptales por especies arbóreas y arbustivas del bosque mediterráneo. El grado de restauración dependerá de la recuperación de las comunidades fúngicas ectomicorrícicas nativas en suelos antes colonizados por una flora fúngica exótica y alterados por los restos de los eucaliptos. Pero las poblaciones fúngicas

introducidas, podrían persistir tras la sustitución de los eucaliptales por árboles autóctonos. La persistencia de una flora fúngica exótica, supondrían un riesgo para el funcionamiento de los bosques de estos espacios naturales.

Era, por tanto, importante estudiar si tras la eliminación de los eucaliptos, la flora microbiana ectomicorrícica introducida con los eucaliptos persiste asociada a las raíces de los árboles plantados. Para responder a este tipo de preguntas, solicitamos un proyecto en la convocatoria de 2003 del programa de investigación del Organismo Autónomo Parques Nacionales, con el título *Hongos exóticos en Parques Nacionales Españoles*, cuyos resultados se presentan en este trabajo. El objetivo de este proyecto, ha sido estudiar, tras la erradicación de los eucaliptos, la posible persistencia de los hongos australianos que fueron introducidos junto con los eucaliptos. En primer lugar, estudiamos las comunidades fúngicas que persisten en los eucaliptos que quedan en el Parque Nacional de Cabañeros. Luego investigamos la posible persistencia de los hongos exóticos en: (i) en potenciales huéspedes nativos, en zonas donde se eliminan los eucaliptos; (ii) en las diversas formaciones vegetales del parque, formadas por potenciales huéspedes autóctonos.

Nuestro estudio, no podía basarse sólo en la recolección de las fructificaciones de estos hongos. Sabíamos que las fructificaciones no reflejan las comunidades reales de hongos ectomicorrícicos. Muchos hongos ectomicorrícicos no fructifican o lo hacen esporádicamente. Otros producen fructificaciones pequeñas que pasan desapercibidas. Y además, los hongos ectomicorrícicos más abundantes suelen ser aquellos que producen menor número de fructificaciones (EGGER, 1995; HORTON & BRUNS, 2001). Por todo ello, para conocer la comunidad de hongos ectomicorrícicos, identificamos directamente los hongos que colonizan las raíces. A partir de DNA extraído de muestras de suelo y de ectomicorrizas, amplificamos regiones ITS que fueron luego secuenciadas. Las secuencias obtenidas para los diferentes morfotipos permitieron la identificación de los simbiontes fúngicos, en la base de datos GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios realizados

Para la consecución de nuestros objetivos de investigación realizamos los siguientes estudios.

- 1.º Estudio de los hongos ectomicorrícicos australianos que fructifican en el Parque Nacional de Cabañeros.
- 2.º Estudio de las ectomicorrizas de los eucaliptos, y de la vegetación donde hubo eucaliptos en el P. N. de Cabañeros. Nuestro estudio comprendió las siguientes zonas: zona-1, donde existen aún eucaliptos; zona-2, donde se han cortado los eucaliptos, pero se dejaron los tocones; zona-3, donde se han arrancado los tocones de los eucaliptos, y se está recuperando la vegetación natural; y zona-4, donde se han arrancado los tocones de los eucaliptos, y se plantaron encinas.
- 3.º Estudio de la presencia de ectomicorrizas de hongos australianos en diversas formaciones forestales del P. N. de Cabañeros. Se estudiaron las ectomicorrizas de las siguientes formaciones: abedulares/saucedas, bosques de quercíneas, pinares, y jarales.
- 4.º Estudio de las comunidades de hongos ectomicorrícicos que colonizan las encinas y alcornoques plantados tras la erradicación de los eucaliptos. Para ellos se introdujeron plantones trampa de un año de encina y alcornoque, en un eucaliptal recién eliminado situado entre el Puerto de Miravete y Cañaverál (Cáceres). Al año siguiente, se analizaron sus ectomicorrizas.

Características generales del área de estudio

El Parque Nacional de Cabañeros (Ciudad Real) y el Puerto de Miravete, que se encuentra cercano al P. N. de Monfragüe (Cáceres), presentan características que les hacían adecuados para realizar nuestros cuatro estudios. En ambos lugares, se da una vegetación mediterránea, con comunidades vegetales diferentes. La particular combinación de clima y topografía hace posible el desarrollo de va-

rias comunidades clímax dominadas por especies del género *Quercus*. En las zonas de sierra dominan bosques de melojos (*Quercus pubescens* Willd.), mientras que las zonas bajas aparecen encinares (*Q. ilex* L.), que alternan con alcornoques (*Q. suber* L.) en zonas más húmedas y suaves. En Cabañeros, también aparece quejigares (*Q. faginea* Lam.) en zonas más húmedas. Tras la degradación de estos bosques, aparecen formaciones de arbustos y matorrales (madroñales y jarales, principalmente). Aparecen también abedulares y saucedas. Para una descripción de las comunidades y series de vegetación, véase RIVAS-MARTÍNEZ (1987). También existen formaciones de *Eucalyptus camaldulensis*, tanto en los parques como en zonas próximas. Y, en ambos lugares, se están eliminando los eucaliptales y sustituyéndolos por árboles y arbustos autóctonos.

Estudio de fructificaciones de hongos ectomicorrícicos en eucaliptales

En el invierno de 2005 se recolectaron fructificaciones que se identificaron con métodos taxonómicos clásicos. Los estudios microscópicos necesarios para su identificación se realizaron en el laboratorio, siguiendo los métodos descritos en MORENO *et al.* (2000).

Estudio de los morfotipos de las ectomicorrizas

Muestreamos raíces de los eucaliptos que quedan en el parque. También recogimos raíces en las formaciones vegetales del P. N. de Cabañeros, para analizar la posible presencia de ectomicorrizas de hongos australianos en potenciales huéspedes nativos. Recogimos raíces de abedules, sauces, quercúneas, pinos, y jarales, y de plantones de encina y alcornoque. Los muestreos se realizaron en el invierno de 2005. En laboratorio se retiraron las partículas de suelo de las raíces, que fueron cuidadosamente lavadas para su observación microscópica. Bajo la lupa estereoscópica se clasificaron las ectomicorrizas por morfotipos, siguiendo la metodología de AGERER (1987-1996) y INGLEBY *et al.* (1990). Tras su clasificación morfológica, las ectomicorrizas se conservaron congeladas, hasta la extracción de DNA para posterior identificación molecular.

Plantaciones de árboles trampa

Plantones de una savia de alcornoque y encina fueron producidos a partir de semillas recogidas en el otoño de 2004, y estratificadas en arena a 4 °C. Fueron germinadas la primavera de 2005 en un sustrato estéril de vermiculita-turba fertilizada (75/25%), mantenidas bajo luz natural en condiciones semiestériles para evitar contactos con posibles inóculos fúngicos. Se plantaron en el otoño de 2006 en un eucaliptal recién eliminado situado entre el Puerto de Miravete y Cañaveral (Cáceres). Fueron plantados a raíz desnuda, previa comprobación bajo la lupa estereoscópica de que carecían de infecciones ectomicorrícicas. En dicho eucaliptal se habían recogido fructificaciones de hongos australianos el año anterior. La plantación se realizó en el otoño de 2006, y los muestreos de raíces se realizaron en el invierno de 2007.

Análisis moleculares de las ectomicorrizas

La identificación molecular de las ectomicorrizas se realizó usando la secuencia de nucleótidos de regiones del ADN ribosomal (ADNr). El ADN de las ectomicorrizas se extrajo según describimos en WEBER *et al.* (2002). A partir del ADN extraído se amplificaron las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) según se describe por WHITE *et al.* (1990). Cuando fue necesario, se identificó molecularmente el huésped que formaba la ectomicorriza (CULLINGS, 1992). Los fragmentos de ADNr amplificados fueron cortados con enzimas de restricción y clasificados por sus patrones de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Fragmentos con patrones RFLP diferentes fueron purificados y secuenciados usando un secuenciador automático modelo ABI 373, con los protocolos de *Applied Biosystems*, USA. Para una descripción más detallada de los métodos moleculares véase MARTIN *et al.* (2000) y DÍEZ *et al.* (2002b).

Análisis moleculares de las muestras de suelos

Se utilizó un método comercial de aislamiento de DNA de suelo (Q-Biogene, France). A continuación se amplificaron por PCR las regiones ITS, véase la sección anterior. La amplificación de una mezcla de ITS de diferentes hongos, hizo necesario clonar los fragmentos amplificados, antes de

realizar su secuenciación. La clonación se realizó en vectores plasmidiales y según se describe en WEBER *et al.* (2002).

Análisis de las secuencias generadas

La identificación específica se realizó con la región ITS. Se amplificaron los insertos por PCR, y se analizaron su tamaño y patrones RFLP. Insertos con patrones RFLP diferentes fueron secuenciados. Para identificar las ectomicorrizas, comparamos las secuencias obtenidas con las disponibles en las bases de datos del Genbank, con ayuda del Programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

En algunos casos la identificación fue afinada mediante análisis filogenéticos. Para ello, las secuencias fueron alineadas con el programa Mutialin (CORPET 1988), y los análisis filogenéticos realizados con el programa PAUP (SWOFFORD, 1999); se siguieron las consideraciones seguidas en trabajos previos (DÍEZ *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Hongos ectomicorrícicos australianos que fructifican en el P. N. de Cabañeros

Las fructificaciones recogidas se identificaron según sus caracteres morfológicos, con la ayuda de lupa, reactivos químicos y microscopio. Bajo los eucaliptos que quedan en P. N. de Cabañeros recogimos 142 fructificaciones de hongos ectomicorrícicos. Los estudios morfológicos, macro y microscópicos, muestran que las fructificaciones recogidas pertenecen a uno de los siguientes hongos ectomicorrícicos australianos: *Hydnangium carneum* Wallr. (n=45), *Hymenogaster albus* (Cooke and Mass.) M.J. Priest (n=33), *Laccaria fraterna* (Cooke & Mass) Pegl. (n=25), *Setchelliogaster rheophyllus* (Ber. & Malenç.) G. Moreno (n=21), y *Tricholoma eucalypticum* Pearson (n=18). Todos ellos son hongos basidiomicéticos.

Los hongos australianos encontrados en el P. N. de Cabañeros, poseen cuerpos fructíferos hipogeos de tipo gastroide, semi-hipogeos de forma secotioide, o epigeos de tipo agaricoide. Las for-

mas secotioide y gastroide, se consideran evolutivamente derivadas de la forma agaricoide, como respuesta a un clima seco (BRUNS *et al.*, 1989). Las formas agaricoide corresponde a un pie que porta un sombrero con laminillas. Las formas secotioides serían formas semi-epigeas en la que el sombrero no llega a abrirse completamente. En las especies secotioides aún pueden reconocerse las láminas, que desaparecen en las formas gastroides.

Con cuerpos fructíferos hipogeos gastroides, tenemos por ejemplo las fructificaciones de *Hymenogaster albus*, e *Hydnangium carneum*; con cuerpos fructíferos semhipogeos de tipo secotioide a *Setchelliogaster rheophyllus*; y con forma agaricoide (epigea), los de *Laccaria fraterna* y *Tricholoma eucalypticum*.

Hydnangium carneum es un hongo gastroide próximo al género *Laccaria*. *Hydnangium carneum* fue co-introducido desde Australia con los eucaliptos. Este hongo hipogeo parece estar bien adaptado a fructificar en el clima seco del Mediterráneo. *Hymenogaster albus* es una falsa trufa (gastroide) de origen Australiana, muy común en plantaciones de *Eucalyptus camaldulensis* en España, y que previamente habíamos encontrado en las zonas cercanas al P. N. de Monfragüe. *Setchelliogaster rheophyllus* es un hongo secotioide que fue co-introducido en el Mediterráneo con los eucaliptos y cuyos cuerpos fructíferos, encontramos bajos los eucaliptos que quedan en el P. N. de Cabañeros. *Tricholoma eucalypticum* es un hongo agaricoide característico de los eucaliptales en Australia. Las fructificaciones que encontramos en el P. N. de Cabañeros, son una de las primeras recolecciones de este hongo fuera de Australia. Este hongo también fructifica en las plantaciones próximas al P. N. de Monfragüe. *Laccaria fraterna* (= *L. lateritia*) es una especie agaricoide nativa de Australia; hemos encontrado fructificaciones de este hongo bajo los eucaliptos que quedan en el P. N. de Cabañeros, y también en algunos de sus jarales. También hemos encontrado este hongo en las plantaciones de eucalipto próximas al P. N. de Monfragüe. Además hemos recolectado fructificaciones de dos ascomicetes australianos, *Urnula rhitidia* (Berk. & Br.) Cooke (n=12) y *Discinella terrestres*

(Berk. & Br.) Dennis (n>100). *Urnula rhitidia* (Pezizales) y *Discinella terrestris* (Leotiales) son originarios de los bosques de Australia y Tasmania. Se trata de dos hongos considerados por algunos autores como saprofitos, y para otros como micorrícicos facultativos.

No encontramos fructificaciones de hongos nativos asociadas a los eucaliptos. De igual modo, durante los muestreos de ectomicorrizas en la vegetación nativa de Cabañeros, no encontramos cuerpos fructíferos de hongos australianos, a excepción de *Laccaria fraterna* que fue encontrado en jarales.

Hongos identificados en las raíces

Ya que la mayoría de las fructificaciones de hongos australianos encontradas pertenecían a basidiomicetes, centramos nuestro estudio en este grupo y utilizamos cebadores específicos para ellos. Para el conjunto de estudios, se extrajo DNA de cuerpos fructíferos y ectomicorrizas, y se amplificó por PCR la región ITS del ADNr, para más de 850 ectomicorrizas y 38 cuerpos fructíferos. Cuando fue necesario, se identificó el huésped que formaba la ectomicorriza mediante la secuencias del ITS vegetal, amplificada con cebadores específicos de plantas.

Se observaron 105 morfotipos de ectomicorrizas, se obtuvieron 90 ribotipos (ITS cuyo RFLP es diferente), de los que secuenciaron 76, lo que nos permitió identificar 64 hongos ectomicorrícicos diferentes. La identificación de las secuencias de DNA fúngico obtenidas fue realizada mediante comparación con las secuencias obtenidas de cuerpos fructíferos, y búsquedas en la base de datos del GenBank. Gracias a ello, de los 90 ribotipos secuenciados, para 64 de ellos se identificó la especie a la que pertenecía; 11 pertenecían a especies de hongos ectomicorrícicos australianos.

Las ectomicorrizas de los eucaliptos que quedan en el P. N. de Cabañeros

El estudio de la morfología de las ectomicorrizas presentes en las raíces recolectadas de los eucaliptos aún presentes en el P. N. de Caballeros (2º es-

tudio), permitió clasificar sus ectomicorrizas en 18 morfotipos. Se obtuvieron los perfiles RFLP, y T-RFLP (ribotipos) para los morfotipos de las micorrizas más frecuentes. A partir de las ectomicorrizas, se obtuvieron 14 ribotipos diferentes, y tras su secuenciación se identificaron las siguientes especies australianas: *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trape & Olivera, *Descomyces albus* (Klotzsch) Bougher & Castellano, *Descolea maculata* Bougher, *Hydnangium carneum* Wallr., *Hymenogaster albus* (Klotzsch) Berk., *Hysterangium inflatum* Rod., *Laccaria fraterna* (Coole & Mass.) Pegl., *Setchelliogaster rheophyllus* (Ber. & Malenç.) G. M. Moreno, *Tricholoma eucalypticum* Pearson, *Pisolithus albus* y *P. microcarpus* (Cooke & Mass.) Cunn. La identificación de las especies *Pisolithus* requirió el empleo de métodos filogenéticos. Los hongos identificados en las raíces de los eucaliptos de Cabañeros, de los que sin embargo no se encontraron fructificaciones, fueron *Chondrogaster angustisporus*, *Descomyces albus*, *Descolea maculata*, *Hysterangium inflatum*, *Pisolithus albus* y *P. microcarpus*.

Chondrogaster angustisporus es un hongo hipogeo australiano que sólo aparece asociado a eucaliptos y otros árboles australianos, y que suele fructificar formando grupos. Al igual que *Laccaria fraterna*, *Ch. angustisporum* destaca por sus basidios bispóricos. A pesar de que no hemos encontrado sus fructificaciones en el P. N. de Cabañero, su presencia queda probada tras su detección en las raíces de los eucaliptos. *Descomyces albus*, que forma ectomicorrizas con mirtáceas en Australia, particularmente con eucaliptos, fue detectado en las raíces de algunos de los eucaliptos que quedan en el parque. Anteriormente, habíamos encontrado sus fructificaciones en formaciones de eucalipto próximas a Mérida (Badajoz). En las ectomicorrizas de tres eucaliptos del P. N. de Cabañeros detectamos a *Descolea maculata*. Esta especie normalmente fructifica en formas agaricoides con tendencia a formas secotioides. En nuestro estudio, también hemos identificado las ectomicorrizas de *Hysterangium inflatum*. Se trata de un hongo hipogeo, que previamente habíamos encontrado en algunas plantaciones próximas al Puerto de Miravete (Cáceres). A pesar de que *Pisolithus albus* y *P. microcarpus* suelen fructificar en las plantaciones de eucalipto de la Pe-

nínsula Ibérica, en el P. N. de Cabañeros, sólo fueron detectados en las raíces de algunos de los eucaliptos.

Ectomicorrizas y micelios edáficos de la vegetación donde existieron eucaliptos en el P. N. de Cabañeros

En las zonas donde se erradicaron los eucaliptos y o bien se plantaron especies nativas (encinas) (zona-4), o bien se produjo una regeneración natural (zona-3), además de muestras de raíces se tomaron muestras de suelo. No fue necesario desarrollar un método de extracción de DNA de suelo, ya que el método comercial utilizado funcionó correctamente. Se amplificó el ITS nuclear en 80 muestras de suelo, para identificar micelios fúngicos. Se utilizaron cebadores específicos para basidiomicetes, ya que los cebadores universales, que también amplifican secuencias para ascomicetes, reproducían patrones de bandas difíciles de interpretar. En cambio, las amplificaciones con los cebadores específicos para basidiomicetes, producían entre 3 y 6 bandas, que en su mayoría fueron identificadas al compararlas con los perfiles obtenidos a partir de las fructificaciones. Para la identificación, 12 bandas de los perfiles RFLP-T de micelios edáficos, que no se correspondían con ninguna de los cuerpos fructíferos, fueron clonadas y secuenciadas. Pudimos identificar 4 especies fúngicas ectomicorrícicas en la base de datos del GenBank; entre ellas dos especies de *Inocybe*. Los perfiles RFLP obtenidos para estas muestras de suelo no corresponden a los hongos australianos presentes en los eucaliptales, sino a especies autóctonas de la Península Ibérica, como *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke & Couch, lo que sugiere que en el P. N. de Cabañeros los hongos australianos no persisten después de la eliminación de los eucaliptos.

Estudio de la presencia de ectomicorrizas de hongos australianos en diversas formaciones vegetales del P. N. de Cabañeros

Ectomicorrizas de abedules/sauces.

En las raíces de abedules y sauces observamos 12 morfotipos diferentes de ectomicorrizas, usando cebadores específicos para los basidiomicetes,

obtuvimos 12 ribotipos diferentes a partir de estos morfotipos. Tras su secuenciación se identificaron ocho especies fúngicas. En abedul (*Betula pendula* Roth) se encontró *Amanita citrina* (Sch:Fr.) Lamark, *Tricholoma fulvum* (Bull.:Fr.) Sacc., y *Lactarius quietus* (Fr:Fr.) Fr.; y en *Salix atrocinera* Brot., *Laccaria tortilis* (Bolt.) Cooke.

Ectomicorrizas de quercúneas.

En las raíces de encinas y quejigos encontramos 28 morfotipos, para los que obtuvimos 22 ribotipos diferentes. De ellos, secuenciamos 18 ribotipos, lo que nos permitió identificar 16 especies. Todas las especies identificadas corresponden a especies fúngicas nativas. Entre las especies identificadas se encuentra, *Amanita fulva* (Scf.:Fr.) Fr. y *Amanita phalloides* (Vaill:Fr.) Link en raíces de *Quercus faginea* Lam.; *Boletus aereus* Bull.:Fr., en raíces de *Quercus suber* L.; y *Boletus rhodoxanthus* (Rombholz) Kallenbach, *Inocybe geophylla* (Fr.:Fr.) Kummer y *Laccaria laccata* (Scop:Fr) Cooke) en raíces de encina (*Quercus ilex* L.).

Ectomicorrizas en pinares.

En las raíces de los pinos encontramos 25 morfotipos diferentes, y amplificamos 16 ribotipos. Se secuenciaron 16 ribotipos, lo que permitió identificar 12 especies de hongos ectomicorrícicos, todos ellas nativos. Entre los especies identificadas se encontraba *Suillus bovinus*, *Scleroderma polyrrhizum*, *Inocybe rimosa* y *Laccaria bicolor*.

Ectomicorrizas en jarales.

En las raíces de jaras observamos 12 morfotipos, de los que conseguimos amplificar y secuenciar 8 ribotipos, cuyas secuencias correspondían a ocho hongos nativos y uno australiano (*Laccaria fraterna*). Entre las especies nativas había especies frecuentes en bosques como *Amanita muscaria*, y también especies específicas de jaras, como *Hygrophorus cistophilus* (L.:K.) Roussel.

Comunidades de hongos ectomicorrícicos que colonizan los plantones trampa de encina/alcornoque

Un año después de su plantación en un antiguo eucaliptal recién eliminado, estudiamos las raíz-

ces de plantones de encinas y alcornoques. En las muestras de las raíces analizadas se observaron ectomicorrizas. Se observó la presencia de 16 morfotipos diferentes de ectomicorrizas, de los que conseguimos amplificar la región ITS para ocho de ellos. Tras su secuenciación, se identificaron ocho especies, fúngicas, todas nativas del Mediterráneo. Entre ellas, se encontraban *Pisolithus tinctorius*, *Amanita fulva*, *Xerocomus chrysenteron* (Bull) Quelét, y *Astraeus hygrometricus* (Pers.:Pers.) Morgan. En las raíces analizadas no se detectó la presencia de ninguna especie de hongo australiano introducido.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos para la identificación molecular de las ectomicorrizas (GLEN *et al.*, 2001; CHEN & CAIRNEY, 2002; DICKIE & FITZJOHN, 2007). En este proyecto hemos utilizado el T-RFLP y la secuenciación de la región ITS del rDNA, para el estudio de las especies fúngicas que forman ectomicorrizas y micelios edáficos. Más de 800 ectomicorrizas han sido analizadas, que corresponden a 90 ribotipos diferentes, de las se identificaron 65 especies, 11 de ellas australianas. Las secuencias de algunos de los ribotipos secuenciados no daban valores significativos de similitud con ninguna de las secuencias del GenBank, y no pudieron ser identificadas. Tampoco conseguimos amplificar la región ITS para algunas ectomicorrizas, bien porque estaban formadas por ascomicetes, porque las regiones de hibridación de los cebadores no están conservadas, o bien porque las condiciones utilizadas en la reacción PCR no permitían su amplificación. Algunos hongos ectomicorrícicos también pudieron pasar desapercibidos debido a su baja frecuencia; debemos recordar que la base del Genbank esta en construcción y sólo se dispone de la secuencia para un número limitado de especies. Por ello, no fue posible identificar todos los hongos. A pesar de ello, creemos que nuestro estudio refleja bien las comunidades fúngicas analizadas. Podemos por ello decir que nuestro estudio nos ha permitido conocer las comunidades de hongos ectomicorrícicos australianos introducidos que aún viven en el P. N. de Cabañeros. También nos ha permitido descubrir un patrón general de com-

portamiento, caracterizado por la ausencia de los hongos australianos en la vegetación natural, y por la desaparición de los hongos australianos tras la erradicación de los eucaliptos y la reforestación con especies autóctonas, o la regeneración natural de la vegetación. Y finalmente, hemos detectado un hongo exótico australiano capaz de saltarse este patrón general y asociarse a un huésped nativo.

El patrón general observado

En un proyecto de investigación anterior, financiado por la Universidad de Alcalá, encontrados que en las plantaciones de eucalipto de la Península Ibérica fructifican especies australianas de hongos ectomicorrícicos (DÍEZ, 2005). Quedaban aún por identificar los hongos ectomicorrícicos exóticos que no fructifican, y que ahora hemos identificados con métodos moleculares sobre muestras de suelos y raíces. Tras nuestro estudio, podemos decir que los hongos exóticos del Parque Nacional de Cabañeros persisten en los eucaliptos, pero no colonizan los potenciales huéspedes ectomicorrícicos nativos. El único hongo australiano introducido que por ahora coloniza los huéspedes nativos es *Laccaria fraterna*, que forma ectomicorrizas con *Cistus ladanifer* L.

Hoy se estima que cualquier especie fúngica introducida puede tener el potencial de alcanzar uno de los cuatro estados siguientes: (i) transporte, (ii) establecimiento, (iii) dispersión e (iv) impacto (LOCKWOOD *et al.*, 2007). Que se acabe dañando los ecosistemas puede ser sólo una cuestión de tiempo, en función de la biología del hongo y de las condiciones ambientales de cada lugar. En teoría, en el caso de los hongos ectomicorrícicos exóticos, nos podemos encontrar con alguna de las siguientes situaciones.

Situación 1. Que fracasen en su establecimiento.

Situación 2. Que se establezcan pero con el tiempo sean remplazados por los hongos locales.

Situación 3. Que persistan con los huéspedes introducidos, pero no colonicen las raíces de potenciales huéspedes locales.

Situación 4. Que persistan con los huéspedes introducidos y además colonicen las raíces de huéspedes locales.

Situación 5. Que no persistan asociadas con los huéspedes introducidos, pero colonicen las raíces de potenciales huéspedes locales.

Situación 6. Que aparezcan nuevas asociaciones simbióticas formadas por hongos y árboles exóticos, pero de diferente procedencia.

Situación 7. Que los hongos exóticos causen impactos negativos.

No todos los hongos introducidos debieron de conseguir establecerse, a la vista del reducido número de especies de hongos ectomicorrícicos exóticos presentes hoy en el P. N. de Cabañeros; los únicos que lo consiguieron fue debido a su carácter invasor. Esto explicaría que nos encontramos en el P. N. de Cabañeros con hongos australianos que también aparecen en otras plantaciones forestales por todo el mundo (GIACHINI *et al.*, 2000; VELLINGA *et al.*, 2009).

En nuestro estudio no encontramos especies nativas que colonizasen las raíces de los eucaliptos. Sin embargo, al menos 11 especies fúngicas exóticas habría alcanzado la “situación 3”, y persisten en los huéspedes introducidos. La mayoría no alcanza la “situación 4”; aunque en los suelos antes ocupados por eucaliptos queden inóculos esporales y miceliarios de los hongos australianos cointroducidos con ellos, no colonizan las raíces de los huéspedes locales. Hace excepción *Laccaria fraterna*, que al menos es capaz de colonizar las raíces de la jara *Cistus ladanifer*. Este comportamiento también fue descrito en *Amanita muscaria* (L.:Fr.) Hooker en Nueva Zelanda y Tasmania, donde se introdujo junto con robles, abedules y pinos, y coloniza las raíces de especies nativas de *Nothofagus* (JOHNSTON *et al.*, 1998). *Laccaria laterita* ha sido introducida desde Australia en muchas otras regiones, incluida India y Japón (VELLINGA, *et al.*, 2009). Diversos trabajos han indicado su posible asociación con jaras en España (DÍEZ, 2005), y con *Pinus* y *Quercus* en Marruecos (MALENÇON, 1966; descrita como

«Hongos exóticos de parques nacionales españoles»

Laccaria lateritia). Incluso, *L. fraterna* ha sido descrita en Australia bajo pinos (DUNSTAN *et al.*, 1998).

Los potenciales impactos ecológicos

No deben olvidarse los impactos ambientales que la introducción de hongos exóticos ectomicorrícicos puede tener, por ejemplo al incrementar la capacidad invasora de sus huéspedes arbóreos, o al modificar los ciclos de nutrientes. La introducción de hongos ectomicorrícicos permite el comportamiento invasor de los pinos en Sudáfrica (RICHARDSON *et al.*, 2000), y sería responsable de la reducción del carbono edáfico en el praderas del páramo de Ecuador (CHAPPEL *et al.*, 2001). Los hongos introducidos pueden también desplazar a los hongos sectomicorrícicos nativos, facilitar la invasión de las especies vegetales exóticas, dañar a las especies forestales nativas, o alterar los ciclos de nutrientes en el suelo.

Desconocemos si se ha alcanzado la “situación 7” (impacto negativo), ya que nuestro estudio no analiza los impactos ambientales que pueden causar los hongos ectomicorrícicos exóticos en los parques nacionales.

Conservación y gestión de los parques nacionales afectados

Resultaría imposible proponer medidas efectivas para la erradicación de *Laccaria fraterna* de los jarales afectados, teniendo en cuenta su posible extensión. Además, es difícil distinguir *Laccaria fraterna* de varias especies de *Laccaria* nativas que también forman ectomicorrizas con jaras.

Para casi la mitad de hongos australianos que colonizan los eucaliptos del P. N. Cabañeros no encontramos fructificaciones; su detección requirió la identificación molecular en las raíces de su huésped. Esto pone de manifiesto la necesidad de utilizar los métodos moleculares para detectar la persistencia de estos hongos exóticos.

Sería necesario realizar una serie de estudios que nos permitan conocer los efectos de la introduc-

ción de estos hongos australianos sobre los hongos ectomicorrícicos nativos, y su impacto final sobre el equilibrio de los ecosistemas. Recomendamos estudiar las poblaciones fúngicas introducidas, y analizar la posible aparición de genotipos capaces de colonizar las raíces de huéspedes nativos. Debido a su importancia, sería de gran interés estudiar la diversidad funcional de las poblaciones de los hongos australianos *Pisolithus albus* y *P. microcarpus*, para lo que se podrían utilizarse marcadores de genes funcionales. Para su desarrollo, venimos colaborando con el Dr. F. Martin (Centre INRA-de Nancy, Francia) quien lidera varios proyectos de secuenciación de genomas de hongos ectomicorrícicos (MARTIN *et al.*, 2008).

Ya que la introducción de especies australianas ha puesto en contrato líneas evolutivas separadas desde hace tiempo. También sería necesario estudiar la posibilidad de formación de híbridos interespecíficos, entre *Laccaria fraterna* y especies nativas de *Laccaria*; ya que es posible, al menos *in vitro*, la formación de híbridos dentro de este género. En tal caso, hibridaciones introgresivas podrían llevar a procesos de erosión genética (RHYMER & SIMBERLOFF, 1996), o la formación de nuevas especies (BRASIER, 2001). Dichos híbridos podrían ser capaces de colonizar otros huéspedes. Para realizar estos estudios, se necesitarán nuevos marcadores moleculares que permitan detectar los híbridos en las raíces. Se podrían utilizar microsátélites, marcadores moleculares derivados de retrotransposones (DÍEZ *et al.*, 2003), o marcadores SCAR (*sequence characterized amplified region*) (WEBER *et al.*, 2002).

Hay que remarcar que el comportamiento de los organismos invasores puede variar con las condiciones ambientales (ARIM *et al.*, 2006). Por ello, los resultados obtenidos en el Parque de Cabañeros no pueden extrapolarse directamente a otros parques nacionales, como los de Monfragüe o Doñana, también afectados por las plantaciones de eucaliptos.

CONCLUSIONES

Nuestro trabajo muestra que existe una rica comunidad fúngica de hongos australianos en los

eucaliptos del Parque Nacional de Cabañeros, pero no en las raíces de la vegetación autóctona. Hace excepción el hongo australiano *Laccaria fraterna* que forma ectomicorrizas con el arbusto nativo *Cistus ladanifer*. Nuestra investigación muestra que los simbiontes fúngicos australianos desaparecen tras la eliminación de los eucaliptos. La detección del hongo australiano *Laccaria fraterna* en las raíces de *C. ladanifer*, señala a las jaras como potenciales refugios de otros hongos ectomicorrícicos australianos. Por ello, a corto plazo, y debido al escaso número de eucaliptos que quedan en Cabañeros, no es de esperar un impacto negativo sobre sus ecosistemas naturales. Para evaluar el riesgo a largo plazo, sería necesario estudiar la evolución de las poblaciones de los hongos exóticos introducidos, y su impacto ambiental. Debido a sus características particulares de otros parques afectados por los eucaliptos, como el de Monfragüe o el de Doñana, su situación podría ser diferente.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados aquí presentados corresponden al proyecto 77/2003 del Organismo Autónomo Parques Naturales, financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marítimo. E. Fernández, participó en algunos de los análisis, gracias a una Beca de Iniciación a la Investigación de la UAH (convocatoria 2004), de enero 2005 a junio de 2005. A. Muriel realizó parte del estudio realizado en las proximidades del Puerto de Miravete. P. Watson participó en parte de los muestreos. G. Moreno estudió las fructificaciones recogidas. Los estudios moleculares fueron realizados por J. Díez, investigador principal del proyecto e investigador contratado del Programa Ramón y Cajal del Ministerio de Ciencia e Innovación (Contrato RC2001/2091). J. Díez agradece al Departamento de Ecología de la UAH, y a su director M. A. Rodríguez, el apoyo prestado durante el último año de este proyecto. Nuestro agradecimiento al P. N. de Cabañeros, y en especial a A. Gómez, por su ayuda durante los muestreos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGERER, R. 1987-1996. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwaesbisch, Germany.
- ALTSCHUL, S. F., T. L. MADDEN, A. A. SCHAFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER & D. J. LIPMAN. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- ANDERSON, I. C., S. M. CHAMBERS & J. W. G. CAIRNEY. 1998. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. *New Phytol.* 138: 151-162.
- ARIM, M., S. R. ABADES, P. E. NEILL, M. LIMA & P. A. MARQUET. 2006. Spread dynamics of invasive species. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 374-378.
- BRASIER, C.M. 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *BioScience* 51(2): 123-133.
- BUSCOT, F., J.C. MUNCH, J.Y. CHARCOSSET, M. GARDES, U. NEHLS & R. HAMMPP. 2001. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 601-614.
- CAIRNEY, J. W. G. 2002. *Pisolithus* – death of the pan-global super fungus. *New Phytol.* 153: 117-131.
- CHAPELA, I. H., L. J. OSHER, T. R. HORTON & M. R. HENN. 2001. Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1733-1740.
- CHEN, D. M. & J. W. G. CAIRNEY. 2002. Investigation of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and other soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. *Mycol. Res.* 106:532-540.
- CORPET, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-10890.
- CULLINGS, K. W. 1992. Designing and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* 1: 233-240.
- DICKIE, I. A. & R. G. FITZJOHN. 2007. Using terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza* 17: 259-270.
- DÍEZ, J. 2005. Invasion biology of Australian ectomycorrhizal fungi introduced with eucalypt plantations into the Iberian Peninsula. *Biol. Invasions* 7: 3-15.
- DÍEZ, J., B. ANTA, J. L. MANJÓN & M. HONRUBIA. 2001. Genetic variability of *Pisolithus* isolates associated with native hosts and exotic eucalyptus in the Western Mediterranean region. *New Phytol.* 149(3): 577-587.
- DÍEZ, J., G. MORENO, J. L. & MANJÓN. 2002. The co-introduction of Australian ectomycorrhizal fungi with eucalypt plantations in the Mediterranean. Potential environmental risks. The 7th International Mycological Congress Oslo. Book of Abstract. p. 288.
- DÍEZ, J., J. L. MANJÓN & F. MARTIN. 2002. Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*) host specificity and edaphic tolerances. *Mycologia* 94(2): 248-258.
- DÍEZ, J., T. BÉGUIRISTAIN, F. LE TACON, J. M. CASACUBERTA & D. TAGU. (2003). Identification of Ty-1 copia retrotransposons in three basidiomycetes: evolutionary relationships and use as molecular markers. *Curr. Genet.* 43: 34-44.
- DUNSTAN, W. A., B. DELL & N. MALAJCZUK. 1998. The diversity of ectomycorrhizal fungi associated with introduced *Pinus* spp. in the Southern Hemisphere, with particular reference to Western Australia. *Mycorrhiza* 8: 71-79.
- EGGER, K. N. 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Can. J. Bot.* 73: s1415-1422.
- GALÁN, R. & G. MORENO. 1998. *Ruhlandiella berolnensis*, an exotic species in Europe. *Mycotaxon* 68: 265-271.
- GIACHINI, A. J., V. L. OLIVEIRA, M. A. CASTELLANO & J. M. TRAPPE. 2000. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. *Mycologia* 92: 1166-1177.

- GLEN, M., I. C. TOMMERUP, N. L. BOUGHER & P. A. O'BRIEN. 2001. Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycol. Res.* 105:843-858.
- GOMES, E. A., E. G. BARROS, M. C. M. KASUYA, E. F. ARAUJO. 1999. Molecular characterisation of *Pisolithus* spp. isolates by rDNA PCR-RFLP. *Mycorrhiza* 8: 197-202.
- GROVE, T. S. & F. LE TACON. 1993. Mycorrhiza in plantation forestry. *Adv. Plant Pathol*, 23: 191-227.
- HONRUBIA, M. 1984. *Labyrinthomyces donkii* Malençon, en el S. E. de España. *Int. J. Mycol. Lich.* 1: 345-349.
- HORTON, T. R. & T. D. BRUNS. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* 10: 1855-1871.
- INGLEBY, K., P. A. MASON, F. T. LAST & L. V. FLEMING. 1990. Identification of ectomycorrhizae. HMSO, London.
- JOHNSTON, P., B. BUCHANAN, J. LEATHWICK & S. MORTIMER. 1998. Fungal invaders. *Australasian Mycol. Newsl.* 17: 48-51.
- LOCKWOOD, J. L., M. F. HOOPES & M. P. MARCHETTI. 2007. *Invasion ecology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- MALENÇON, G. 1966. *Laccaria lateritia* n. sp., espèce thermophile. *Bull. Tr. Soc. Mycol. France* 82: 181-189.
- MARTIN *et al.* 2008. The genome of *Laccaria laccata* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452(7183):88-92.
- MARTIN, F., C. DELARUELLE & M. IVORY. 1998. Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Azelia* in Lowland Kenyan forests. *New Phytol.* 139: 341-352.
- MARTIN, F., J. DÍEZ, B. DELL & C. DELARUELLE. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* 153: 345-357.
- MARTÍN, M. P., J. DÍEZ, & J. L. MANJÓN. 2000. Methods used for studies in molecular ecology of ectomycorrhizae. Cap. 2.3. In: Martín M.P. (Ed.). *Methods in root-soil interactions research protocols*. Slovenian Forestry Institute Press, Slovenia. pp. 25-28.
- MORENO, G., J. DÍEZ & J. L. MANJÓN. 2000. Two uncommon hypogeous fungi (*Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*) found in Spain. *Mycol. Res.* 104(3): 378-381.
- PARLADÉ, J., I. F. ALVAREZ & J. PERA. 1996. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza* 6: 51-55.
- RHYMER, J. M. & D. SIMBERLOFF. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27:83-109.
- RICHARDSON, D. M., N. ALLSOPP, C. M. D'ANTONIO, S. J. MILTON & M. REJMANEK. 2000. Plant invasions - the role of mutualisms. *Biol. Rev.* 75(1):65-93.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. 1987. Memoria del mapa de series de vegetación de España. Publicaciones del MAPA. Madrid.
- SMITH, S. E. & READ D. J. (eds). 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, New York.
- SWOFFORD, D. L. 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.08b8. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- VELLINGA, E. C., E. W. BENJAMIN & A. PRINGLE. 2009. Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytol.* 181:960-973.
- WEBER, J., J. DÍEZ, M. A. SELOSSE, D. TAGU & F. LE TACON. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in Europe Douglas-fir plantations. *Mycorrhiza* 12: 19-27.