DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA FORESTAL
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MONTES
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ENTOMOFAUNA ASOCIADA AL HONGO MICORRÍCICO
***Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quél.**

TESIS DOCTORAL

VERÓNICA TOBAR DOMÍNGUEZ

Ingeniera de Montes

DIRECTOR:

LUIS MIGUEL CASTRESANA ESTRADA

Doctor Ingeniero Agrónomo

MADRID, 2014

Tribunal nombrado por el Mgfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día de de 20...

Presidente D.

Vocal D.

Vocal D.

Vocal D.

Secretario D.

Realizado el acto de defensa y lectura de la Tesis el
día de de 20...

Calificación.

EL PRESIDENTE

PRIMER VOCAL

SEGUNDO VOCAL

TERCER VOCAL

EL SECRETARIO

Entomofauna asociada
al hongo micorrícico
***Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Qué.**

Agradecimientos

Agradecimientos.

A mi familia.

A mi director, por confiar en mi proyecto.

A todos los profesionales que han participado en el trabajo como Dr. Manuel Cortijo y Dra. M^a Paz Arraiza de la Unidad de Análisis Instrumental y Operaciones Básicas del Departamento de Ingeniería Forestal, Unidad de Zoología y Entomología Aplicada de la E.T.S.I de Montes de la U.P.M, Dra. Susana Martín del Departamento de Ingeniería y Gestión forestal de la misma E.T.S.I.M., Dra. Consuelo Sanchez-Brunete y Dra. Rosana Pérez del Departamento de Medioambiente, Unidad de Química Ambiental de el I.N.I.A, Dr. Manuel González del Departamento de Protección Vegetal, Unidad de Entomología agroforestal también de el I.N.I.A. y al Dr. Peter Chandler, taxónomo especialista de micetofílidos de la Royal Entomological Society of London.

Y a todas las personas que se han puesto en contacto conmigo o se han interesado de alguna manera por este trabajo.

Resumen

Resumen

Se trabaja con poblaciones silvestres del hongo comestible *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. Los principales daños producidos por la entomofauna asociada a este hongo los realizan dípteros fungívoros que parasitan sus carpóforos y, la depreciación causada, asciende a un cuarto de la producción. Fundamentalmente se trata de dípteros de la familia Mycetophilidae. Se define como principal especie parásita a *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818), con una prevalencia en sus parasitaciones del 18%, asociándola por primera vez a este hongo. Resulta una segunda especie parásita: *Rymosia pseudocretensis* Burghelle-Balacesco, 1967 con menor prevalencia de parasitación, 5,6 %. Además, éstos daños se comprueban en setas silvestres comercializadas, siendo mayores los porcentajes de setas afectadas, del 40% de la compra, no siendo permitida esta contaminación por la normativa vigente. Las peculiaridades de la propia parasitación: las larvas no dañan los tejidos externos y el carpóforo no sintomatiza la parasitación, completan la dificultad para detectar setas contaminadas sin tener que seccionarlas, práctica que tampoco permite la legislación.

Así mismo, se desarrollan una serie de estudios y seguimientos, tanto en campo como en laboratorio, que definen la etología y ecología de los parásitos, estudiando en mayor profundidad el ciclo biológico de *T.fenestralis*: la puesta se lleva a cabo en los carpóforos inmaduros, colocándola en el tercio superior del pie. Las larvas transcurren sus cuatro estadios larvarios dentro del carpóforo. Cuando alcanzan su tamaño máximo salen a través del pie hacia el sustrato, se entierran en el suelo y construyen un capullo sedoso que protege a una pupa libre. La pupación dura nueve días hasta la emergencia de los imagos; éstos vivirán unas semanas, teniendo vuelos crepusculares muy cercanos a los afloramientos de la planta micorrizada asociada.

Se realiza la taxonomía e identificación de los adultos de *T.fenestralis* y de *R.pseudocretensis*. También se describen los dos últimos estadios larvarios de ambas especies, no descritas con anterioridad. Se llegan a identificar rasgos característicos de cada estadio evolutivo.

Una vez que los resultados aumentan el conocimiento sobre estas parasitaciones, se plantea la posibilidad de ejercer un control de estos fungívoros en su hábitat natural. Por tratarse de producciones extensivas se discuten las posibles técnicas y sus limitaciones, aportando propuestas acorde con el ciclo biológico de los parásitos. Se practica un primer control biológico de los dípteros utilizando un atrayente: proteína hidrolizada. Posteriormente, dado cuenta de la especificidad que muestran las principales especies parásitas, se desarrolla un protocolo de búsqueda de aromas a través de la Micro-extracción en Fase Sólida que basa en los aromas emitidos por el hongo en el momento fenológico en el que es parasitado. Este ámbito supone la línea de investigación actual.

Palabras clave: *Pleurotus eryngii*, *Tarnania*, *Rymosia*, fungivoridae, Mycetophilidae, hongos silvestres.

Abstract

This report focuses on wild population of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. A quarter of the mushrooms are damaged by diptera fungivoridae. The main parasite has resulted to be *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) affecting on the 18% of the fungi population. This parasite is a first record on *P.eryngii*. As secondary parasite appear: *Rymosia pseudocretensis* Burghel-Balacesco, 1967 with a 5.6% of incidence. Besides, similar damages were studied in wild mushrooms purchased from specialized greengrocers. Damage reached was 40%. This contamination is over regulations. The particularities of the parasitization: there are no symptoms from the mushroom or external damage from larvae, make difficult to detect unless the mushroom was sectioned (not permitted by the regulations).

Several studies and monitoring are developed to show the ethology and ecology aspects of this parasitism, focuses on life cycle *T.fenestralis*: eggs lay is placed into the stem, near to the grills, in the immature stages of the mushrooms. The development of larvae involves four instars. Larvae feed of the internal tissues of the fungi getting a large size and going towards the internal of the stem to the ground; then larvae are buried there. Make a silky cocoon and a free pupa inside. Nine days later, the imagoes emerge. Imagoes live for a short time (a couple of weeks) and shows crepuscular habits near to the micorrization plants.

Once we have achieved the first conclusions about the parasitic behavior, we consider their control. Different kind of control and his limitations are discussed. Even a biological control is practiced: traps with a generic dipteran appealing: hydrolyzed protein. Realized about the specialization of this species, we are working in a searching protocol to find the correct appealing by SPME Analalysis, searching only in the immature mushrooms available to parasitize. It supposes the new line to investigation.

Image taxonomy and identification is related. Also has been possible to describe the larval of both parasitic, unrelated before.

Key words: *Pleurotus eryngii*, *Tarnania*, *Rymosia*, fungivoridae, Mycetophilidae, wild mushrooms.

Índice

Índice

Capítulo 0: Justificación y objetivos	23
0.1 Referencias bibliográficas al Capítulo 0	27
Capítulo 1: Introducción	29
1.1 El consumo de hongos silvestres. Sectores económicos y sociales implicados	31
1.2 Los hongos silvestres en la zona de estudio: encuadre general	34
1.3 Ecología del hongo <i>Pleurotus eryngii</i> (DC.: Fr.) Qué (1872) var. <i>Eryngii</i>	40
1.4 Daños y beneficios generales que puede producir la fauna asociada a los hongos silvestres	42
1.5 El control de la entomofauna asociada a daños en las setas silvestres	46
1.6 Referencias bibliográficas en el Capítulo 1	47
Capítulo 2: Material y métodos	53
2.1 Definición y características de la zona de estudio	56
2.2 Prevalencias de parasitación	61
2.2.1 Toma de muestras	61
2.2.2 Análisis estadístico	69
2.3 Ensayo de control de dípteros mediante atrayentes	71
2.4 Presencia de parásitos en setas comercializadas.	
Estudio de mercado	76
2.4.1 Toma de muestras	77
2.4.2 Análisis estadístico	77
2.5 Respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial	78
2.6 Cría de larvas para la obtención de adultos en laboratorio	83
2.6.1 Toma de muestras	84
2.6.2 Análisis estadístico	86
2.7 Estudio del momento de la puesta	90
2.8 Cuarentenas de carpóforos aparentemente no parasitados	92
2.8.1 Análisis estadístico	93
2.9 Observaciones al microscopio de carpóforos parasitados	94

2.10 Identificación taxonómica de los parásitos resultantes.....	95
2.11 Descripción de los últimos estadios larvarios de los principales parásitos resultantes.....	96
2.12 Análisis de aromas por Micro-extracción en Fase Sólida	98
2.12.1 Toma de muestras.....	106
2.12.2 Elección del tipo de fibra.....	108
2.12.3 El método de Análisis de analitos por CG-MS.....	111
2.13 Referencias bibliográficas en el Capítulo 2	112
Capítulo 3: Resultados	125
3.1 Prevalencia de parasitación	127
3.2 Dinámica de las poblaciones parásitas en relación con la dinámica de las poblaciones del hongo hospedante.....	136
3.3 Producción de <i>Pleurotus eryngii</i> en la zona de estudio	154
3.4 Ensayo de control de dípteros mediante atrayentes.....	154
3.5 Presencia de parásitos en setas comercializadas. Estudio de mercado.....	157
3.6 Respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial.....	164
3.7 Cría de larvas para la obtención de adultos en laboratorio.....	165
3.8 Estudio del momento de la puesta	181
3.9 Cuarentenas de carpóforos aparentemente no parasitados.....	183
3.10 Observaciones al microscopio de carpóforos parasitados.....	186
3.11 Identificación taxonómica de los parásitos resultantes.....	189
3.12 Descripción de los últimos estadios larvarios de los principales parásitos resultantes.....	199
3.13 Análisis de aromas por Micro-extracción en Fase Sólida	213
3.14 Referencias bibliográficas en el Capítulo 3	216
Capítulo 4: Discusión	219
4.1 Revisión bibliográfica de <i>Tarnania fenestralis</i> asociado a <i>Pleurotus eryngii</i>	221
4.2 Ecología y etología de <i>Tarnania fenestralis</i> . Ciclo biológico del parásito en <i>Pleurotus eryngii</i>	225
4.3 Revisión bibliográfica de <i>Rymosia pseudocretensis</i> asociado a <i>Pleurotus eryngii</i>	236

4.4 Incidencia de <i>Tarnania fenestralis</i> y <i>Rymosia pseudocretensis</i> en las producciones silvestres de <i>Pleurotus eryngii</i>	238
4.5 Las larvas de dípteros en el consumo de hongos silvestres.....	242
4.6 Propuesta de control.....	245
4.6.1 Medidas sanitarias.....	245
4.6.2 Prácticas culturales.....	246
4.6.3 Control biológico.....	250
4.6.4 Formas químicas de control.Fitosanitarios permitidos.....	253
4.7 Referencias bibliográficas en el Capítulo 4	258
Capítulo 5: Conclusiones	269
Capítulo 6: Difusión de resultados	273
6.1 Publicaciones en revistas.....	275
6.2 Ponencias en congresos.....	275
Capítulo 7: Anejos.....	277
7.1 Análisis de aromas por SPME. Tablas y Diagramas de áreas de los analitos.....	279

Capitulo 0. Justificación y objetivos

Justificación y objetivos.

Los productos micológicos silvestres son cada vez más valorados en la gastronomía. Gran parte del auge que presenta actualmente el recurso micológico, y que está haciendo de las setas silvestres un ingrediente privilegiado, es su exclusividad por tratarse de un producto de temporada. Este producto está limitado a restaurantes, comercios especializados o personas con ciertos conocimientos que se requieren a la hora de la identificación de las diferentes especies para su recolección (conocimientos ancestrales que llegan a ser muy valorados).

Se considera el recurso, por tanto, una herramienta de desarrollo rural y al aprovechamiento micológico un beneficio más del lugar (García, 2008).

La demanda de información sobre la situación micológica de los hongos comestibles silvestres ha hecho que muchos organismos subvencionen y propongan cada vez más estudios relacionados con el recurso. Por citar algunos trabajos sobre la zona de estudio, se encuentran los llevados a cabo por la Junta de Castilla y León de regulación y comercialización micológica MyasRC¹, el Sistema informático territorial sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico de Castilla y León²; "Truffled Mediterranean forest improvement: an example of sustainable management"³ llevado a cabo en Soria; Micología y aprovechamiento sostenible en montes de utilidad pública de la zona de Pinares de Almazán, también en Soria⁴; Producción, caracterización y seguimiento en campo de planta inoculada con hongos ectomicorrícicos comestibles⁵. La mayor parte de estos trabajos se centran en hongos micorrícicos presentes en montes

¹Proyecto de la Junta de Castilla y León. Disponible en: <http://www.myasrc.es/Contenido/Proyecto>. [Consulta de la web el 27/03/2014].

²Proyecto de la Junta de Castilla y León. Disponible en: <http://visor.micodata.es/>. [Consulta de la web el 27/03/2014].

³Proyecto LIFE 99 ENV/E/000356. Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/life/>. [Consulta de la web el 57/02/2014].

⁴Proyecto LIFE 00 ENV/E/544 MYAS. Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/life/>. [Consulta de la web el 22/03/2014].

⁵Proyecto INIA SC00-002-C2-1. Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/life/>. [Consulta de la web el 27/01/2014].

ordenados, y tratan de gestionar y valorar el aprovechamiento así como potenciar la productividad en la zona.

Pleurotus eryngii se trata de uno de los hongos comestibles más apreciados en la gastronomía mediterránea, incluida en el listado de patrimonio gastronómico de la Junta de Castilla y León (Junta de Castilla y León, 2012-2014), y está posicionado entre los más demandados a nivel mundial: *Boletus* grupo *edulis*, *Lactarius* grupo *deliciosus*, *Morchella* spp., *Cantharellus cibarius*, *Tuber melanosporum*, *Amanita caesarea*, *Calocybe gambosa*, *Marasmius oreades*, *Pleurotus eryngii*, *Tricholoma portentosum*, *Tuber aestivum*, *Hygrophorus* spp., *Hygrophorus marzuolus*, *Helvella* spp., *Lepista* spp., *Macrolepiota* spp., *Agaricus* spp., etc. (Martínez-Peña *et al.*, 2007).

Sin embargo, según las revisiones bibliográficas realizadas, se considera objeto de pocos estudios dentro de su hábitat natural. Las ordenaciones micológicas y sus inventarios o modelos de estimación de la producción no suelen considerar como variable de la modelización o inventariar específicamente a este hongo (Oria de Rueda, 1991 y 2009; Arnolds, 1995). Su hábitat natural, suelos con vocación agrícola y en desuso, se aleja de los límites de los montes ordenados. Las praderas productoras de seta de cardo tampoco suelen tenerse presentes en las ordenaciones agronómicas por tratarse de tierras agrícolas en situaciones de abandono permanente, baldíos o eriales. Tal vez el hábitat natural de la seta de cardo se vea incluida en estudios de ámbito pastoral, pero no se han encontrados trabajos sobre *P.eryngii* como importante para las costumbres alimenticias del ganado.

Sí parece haber interesado al sector del cultivo intensivo por la alta demanda del consumidor. Los primeros estudios sobre *P.eryngii* exclusivamente se centraron en conseguir el ciclo de producción artificial del hongo (Zadrazil, 1976; Meiyong, 1998; Ramírez *et al.*, 2003; Gaitán-Hernández, 2005).

Más escasos son los estudios de los daños específicos de esta especie: las bacterias que lo deprecian (Ferri, 1984), sus hongos competidores

(Sobieralski, 2010) o la relación de los insectos micófagos asociados (Tobar *et al.*, 2010).

Este trabajo se centra en las poblaciones naturales de *Pleurotus eryngii* en su variedad *eryngii*. El objetivo es definir y caracterizar la principal entomofauna parásita asociada al hongo y que genera daños en su carpóforo, comúnmente llamado seta. Para ello se realizará el encuadre taxonómico de las especies encontradas que produzcan daños y determinará, en la medida de lo posible, su ciclo biológico completo; además se realizará la descripción de los estadios larvarios. Finalmente se evaluarán los daños que deprecian el producto y que se producen en su hábitat natural y se tratará de reunir la mayor información para, posteriormente, analizar si es posible reducir estos daños en su hábitat natural.

Se reflejan en esta memoria una serie de relaciones hongo-entomofauna que se desarrollan en su medio natural, que al fin y al cabo, es en dónde se desarrolla la seta con sus características intrínsecas óptimas, dónde además de generar un producto de calidad, representa una riqueza del medio rural para la que esta investigación amplía una serie de herramientas de uso que sirvan para mejorarlo.

Para este proyecto se ha elaborado una metodología de trabajo sobre el análisis de las poblaciones de setas silvestres en su medio natural. Una serie de estudios de los cuales se expone su fundamentación y objetivos, las bases para el diseño de la metodología y, en su caso, las limitaciones que ha presentado en campo. Un total de nueve estudios diferentes que permiten el seguimiento de las relaciones establecidas entre hongo y entomofauna y que atienden a dos líneas de trabajo bien diferenciadas: la primera de ellas encaminada a determinar la importancia de las parasitaciones y daños encontrados en los carpóforos. La otra línea de trabajo está dirigida al estudio entomológico de las especies asociadas a este hongo. Esta misma metodología podría ser de aplicación en el estudio de entomofauna asociada a daños en otros hongos silvestres.

En el trabajo se da cuenta de la presencia de dípteros parásitos en ejemplares de éste y otros hongos silvestres comercializados, llegando así a nuestra cadena de consumo. Se incluyen nociones para controlar las poblaciones de éstos parásitos en su hábitat, mejorando así la calidad de las recolecciones. Además se proporcionan datos y cálculos de producción de *P. eryngii* en el lugar donde se lleva a cabo el estudio así cómo la relación entre la dinámica poblacional del hongo y la entomofauna que lo rodea.

Todo ello encaminado al conocimiento de las especies que dañan a la seta de cardo en su ambiente natural, tratar de reducir sus efectos, y disfrutar de éste producto lo más inalterado posible (Fig.1.).

INGREDIENTES (6 Pax)

Arroz:

200 gr. arroz semicocido
150 gr. nata líquida
C/S trufa negra liofilizada.
Sal

Torrezno de Cigala:

6 cigalas medianas
C.S. Polvo de Torrezno
Aceite de oliva

Setas de Cardo:

Aceite
10 gr. Setas de Cardo frescas
Agua

Salsa:

10 Cl. vinagre de Módena
20 Cl. jugo de Trufa
50 Cl. fondo de Cerdo

ELABORACIÓN:

Arroz: Mezclar los ingredientes en caliente y dar punta de sal

Torrezno: Insertar las cigalas en brochetas, empanar con el polvo de torrezno y freír en aceite muy caliente.

Setas de cardo: Poner en una sartén una cucharada de aceite, añadir el agua y las setas y saltear.

Salsa: Reducir a seco el vinagre, añadir el fondo y el jugo de trufa. Cocer, poner de sal y trabar la salsa.

Fig.1. Alta gastronomía asociada al hongo *Pleurotus eryngii* por el cocinero Carlos de Pablo en Madrid Fusión, 2014 (Pérez Andrés, 2014) ⁶.

"Resulta difícil, sin duda, atraer la atención del público y la crítica gastronómica desde un restaurante llamado Casa Vallecas ubicado en un pequeño municipio soriano como Berlanga de Duero. Pero De Pablo lo consigue a través de una delicada interpretación de la cocina popular castellano leonesa iluminada por brillantes destellos de creatividad y genio culinario, virtudes que se reflejan muy especialmente en sus platos de caza y setas. (...) Carlos de Pablo no es muy amigo de trabajar con un exceso de referencias de setas. Aunque domina más de una veintena de ejemplares y conoce perfectamente el espectro micológico, se inclina por trabajar con sólo ocho clases: boletales (en Soria se llaman Migueles), lactarius, pleurotus, amanitas, colmenillas, perrechicos y, por supuesto, la trufa negra" (Pérez Andrés, 2014).

⁶ Disponible en: http://www.madridfusion.net/p_chefs.php?id=0000000210. [Consulta de la web el 27/03/2014].

0.1. Referencias bibliográficas al Capítulo 0.

Arnolds, E. (1995). Conservation and Management of Natural-Populations of Edible Fungi. *Canadian Journal of Botany*, 73, 987-998.

Ferri, F. (1984). Bacterial diseases in fungi of the genus *Pleurotus*. *Mushroom Information*, 2(9), 47-54.

Gaitán-Hernández, R. (2005). Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. *Revista mexicana de micología*, 21, 77-84.

García, A. L. (2008). El aprovechamiento micológico como vía de desarrollo rural en España: las facetas comercial y recreativa. *Anales de Geografía de la Universidad Complutense*, 28 (2), 111-136.

Junta de Castilla y León (2012-2014). Patrimonio Gastronómico (On-line). Actualizado: 01/01/2014. [Fecha de consulta: 01/02/2014]. Disponible en: http://www.patrimoniogastronomico.com/productossilvestres_c.shtml?idboletin=131&idseccion=330&idarticulo=3393.

Martínez - Peña, F., Gómez Conejo, R., Ortega-Matínez, P. (2007). MICODATA - Sistema de Información Geográfica sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico en Castilla y León (On-line). Actualizado: 10/03/2014. [Fecha de consulta: 15/03/2014]. Disponible en: <http://www.micodata.es>

Meiying, G. (1998). Biological Characteristics of a Valuable Mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Fujian Journal of Journal of Agricultural Sciencies*, 3, 16-19.

Oria de Rueda, J.A., Martínez de Azagra, A., Salvador Nemoz, L. (1991). Ecología y Productividad de *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Qué. *Boletín de la Sociedad micológica de Madrid*, 15, 5-12.

Oria De Rueda, J. A., y Olaizola, J. (2009). Selvicultura y ordenación micológica de montes arbolados y desarbolados en Castilla y León. *Sociedad Española de Ciencias Forestales y la Junta de Castilla y León. En Actas del Congreso Forestal Español 5º, Ávila, 21 y 25 de septiembre de 2009*, 125-129.

Pérez Andrés, J. (2014). Madrid Fusion (On-line). Actualizado: 10/05/2014. [Fecha de consulta: 27/03/2014]. Disponible en: http://www.madridfusion.net/p_chefs.php?id=0000000210.

Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C., y Martínez, C. (2003). Caracterización de la casa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 64-72.

Sobieralski, K., Siwulski, M., Górski, R., Frużyńska-Józwiak, D., y Nowak-Sowińska, M. (2010). Impact of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* isolates on yielding and morphological features of *Pleurotus eryngii*. *Phytopatologia*, 56, 17-25.

Tobar, V. Notario, A. Castresana, L. (2010). *Tarnania fenestralis* (Diptera: Mycetophilidae) associated with *Pleurotus eryngii*. *Forest Systems*, 19(3), 299-305.

Zadražil, F. (1976). The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. *Mykofarm Gesellschaft für Pilzkultur*, 9 (10), 621–625.

Capítulo 1. Introducción

Agrietada o cuarteda

Asurcada

Con placas

Escamosa

Fribilosa

Hirta

Imbricada

Lisa

Rimosa

Tomentosa

Verrugosa

Zonada

1.1 El consumo de hongos silvestres. Sectores económicos y sociales implicados.

La búsqueda de nuevos recursos naturales que explotar, el interés por lo ambiental de nuestra sociedad actual o como consecuencia de una economía basada en buena medida en el sector turístico, o con toda probabilidad por todo ello al mismo tiempo, lo cierto es que lo micológico ha experimentado una gran expansión en los últimos años (Roig, 2005).

Según fuentes de FAO, la recogida, consumo y mercado de hongos silvestres en el mundo genera 1,35 billones de euros y, el comercio asociado, apoya el desarrollo rural por suponer unos beneficios locales importantes (FAO, 2001). La recolección para la comercialización de hongos silvestres comestibles se centra en los países del sur y este de Europa, China, Canadá, Estados Unidos, Méjico, Chile, Turquía y algunos países africanos, y localizándose los principales mercados receptores en Europa Occidental, Japón y Norte América (Boa, 2004). Pero a pesar de esta creciente importancia, la investigación en materia de cuantificación y valoración del aprovechamiento micológico es incipiente. No existen estadísticas ni estimaciones fiables a escala global de los volúmenes de hongos silvestres comestibles recolectados y comercializados en el mundo, siendo los datos publicados parciales, dispersos y heterogéneos (Pilz y Molina, 2002 ; Boa, 2004; Pérez Moreno, 2008).

En España la gestión de los hongos silvestres y la difusión de esta cultura es actual y va en aumento. El proyecto para la regulación, comercialización e investigación de los recursos micológicos de Castilla y León promovido por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León fue pionero a nivel nacional en el 2009 y sigue vigente en la actualidad⁷. Éste proyecto tuvo su réplica en Cataluña. Un paso aún más restrictivo es la

⁷ Este proyecto ha desarrollado múltiples iniciativas como Mycodata, MycoInfo etc... que hoy en día funcionan desde la misma página web y que están en constante evolución. Disponible en:

<http://www.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1228180300973>

[Consulta de la web el 19/10/2014].

inminente aparición de las primeras reservas micológicas integrales de España⁸. A medida que aumenta la gestión del recurso natural se obtienen más datos sobre la producción y la localización de los hongos silvestres consumibles.

Muchas zonas rurales españolas se han visto abocadas a una reconversión en dos sentidos: hacia un turismo natural que ofrezca novedades al visitante, y hacia la ordenación y gestión de producciones alternativas de sus terrenos. Es en esta coyuntura dónde el interés por los hongos ha fructificado y se ha expandido más allá de los beneficios que ya proporcionaban estas aficiones ancestrales.

Los hongos silvestres o “frutos que la cosa da por sí”⁹ se introducen de forma más notoria que nunca en los sectores económicos y sociales que se citan a continuación y que en definitiva se traducen en gente interesada que motiva estudios como el presente:

Los recolectores tienen información valiosísima sobre las especies recolectadas, producciones esperables, rendimientos de la recolección y variabilidad de las cosechas. El destino de lo recogido, su significación para la economía personal y familiar, los precios obtenidos por las distintas especies recogidas, la facilidad de venta de éstas y las comarcas en que actúa, son esenciales para estimar la trascendencia del recurso para la población.

Los compradores directos conocen mejor que nadie el mercado de las setas, su problemática y la demanda potencial.

Las empresas conserveras permiten revalorizar un producto de temporada como éste, que podría consumirse a lo largo de todo el año

⁸ En septiembre del año 2013, a través de la iniciativa del Ejecutivo central, la Junta de Castilla y León y la Diputación de Ávila, se proyecta instalar las dos primeras figuras de protección total del recurso micológico en el Valle de Gredos y la Sierra de Iruelas. Disponible en: www.diputacionavila.es [Consulta de la web el 10/09/2014].

⁹ Definición de seta del antiguo Código Civil Español, art.355, primer párrafo. En su versión actual define a estos frutos naturales como “producciones espontáneas de la tierra”.

salvando así la importante limitación por su carácter perecedero y por su vecería y suponen una fuente adicional de empleo que puede quedar en la región.

Las fruterías son los centros de suministro más cercanos al “hombre de la calle” y son, probablemente, los más afectados por la problemática legal y la calidad higiénica del producto.

Los restaurantes al elaborar el producto son fuente directa de divulgación de sus posibilidades culinarias, y pueden presentar los platos como una oferta exclusiva de la región, revalorizando el producto hasta que el cliente lo permita. Se estima que el 52% de los restaurantes del medio rural de Castilla y León incluyen setas silvestres en sus cartas y el 68% de ellos participarían en actividades de formación relacionadas con la gastronomía micológica (Martínez-Peña *et al.*, 2007).

El turismo es un sector indirecto también implicado. En Castilla y León el 54% de los alojamientos del ámbito rural de la región tienen clientes micoturistas, procedentes principalmente de País Vasco, Cataluña, Madrid, Comunidad Valenciana, Aragón y Navarra. Un estudio realizado en la comarca de Pinares de Soria-Burgos, muestra como los recolectores foráneos visitan la comarca 2,8 veces al año y permanecen 2,9 días por visita. El 93,6 % de dichos recolectores utilizó algún servicio turístico de la comarca, el 35 % restaurantes, el 37 % hoteles y el 6,5 % casas rurales (Martínez-Peña y García-Cid, 2003).

Existe otro sector potencial muy interesante para el estudio de los hongos silvestres y que deriva de la fuerte demanda que generan ciertas especies que no puede ser satisfecha de forma natural: El sector del cultivo artificial. Este cultivo controlado tratará siempre de preservar la mayor parte de las características del hongo en su condición natural. Para la seta de cardo, el cultivo ha estado presentando fracasos (Jiménez, 2009) que actualmente empiezan a subsanarse: “*Pleurotus eryngii* es más difícil y más lento en crecer

y también tiende a tener producciones más bajas que otras especies cultivadas de *Pleurotus* spp., pero las nuevas tecnologías adecuadas a él en particular, hacen que su producción se potencie y se logre una producción homogénea y constante en el tiempo, lo cual permite surtir durante todo el año el mercado” (Anderson y Farrar, 1994). Según García, es un hongo de mejor calidad que otras especies del género *Pleurotus*, pero su cultivo es más difícil. Algunos cultivos de *P. eryngii* que han presentado un desarrollo aceptable de hongos son los que se han realizado especialmente en España, Francia e Italia (García, 1998; García *et al.*, 2005). Actualmente el cultivo de *P.eryngii* se centra en China, Japón, Corea e Indonesia no siendo abundante en su forma silvestre en estos lugares y, en concreto en estos dos últimos países, fuera de su distribución natural (Wang *et al.*, 2010). Pero el consumo de este hongo se deriva a Europa y Norte América (Mushwold, 1998; Echeverría y Ruminot, 2004).

Para todos estos sectores tiene capacidad de utilización este estudio, motivándose sus trabajos en problemáticas comunes a todos ellos: la depreciación del producto por daños generados por la entomofauna asociada.

1.2 Los hongos silvestres en la zona de estudio: encuadre general.

El estudio se lleva a cabo en Castilla y León puesto que la aptitud para la producción de hongos silvestres comestibles de importancia socioeconómica es elevada (De Frutos Madrazo *et al.*, 2008). Según refleja el Mapa de potencial micológico en Castilla y León que proporciona el proyecto Myas Rc y que se muestra en la figura nº 2; en el mapa se clasifican los hábitats de producción micológica por colores correspondiendo los pastos (color amarillo) al de *Pleurotus* spp. y se aprecia que, en la zona de estudio elegida (rodeada de un círculo rojo), se han instalado varios puntos de muestreo micológico debido a la importancia del recurso en este lugar (en puntos color rojo).

La producción media generada por hongos silvestres comestibles en Castilla y León se ha valorado en 91 millones de euros anuales, pudiendo llegar a triplicarse este valor en años buenos. En la actualidad, la recolección de setas implica al 54% de la población rural de esta comunidad, lo que supone 567.715 de recolectores. El 14% de dicha población vende el producto recolectado, estimándose una capacidad para recolectar y comercializar de hasta 34.000 toneladas de setas en años de buena producción, con una generación potencial de rentas directas a los recolectores de 65 millones de euros al año (Martínez-Peña *et al.*, 2011).

La mico gastronomía representa el 15% de la facturación de los restaurantes de la Comunidad. Soria y León son las provincias que más mico turistas reciben, debido a su capacidad productiva y a que poseen las especies más demandadas. De este modo, establecieron que los 42.000 mico turistas que visitan anualmente la región gastan aproximadamente 4,6 millones, una cantidad que posibilita la creación de 180 empleos equivalentes a tiempo completo en el medio rural durante la campaña micológica (De Frutos Madrazo, 2012).

Fig.2. Mapa de aptitudes micológicas de Castilla y León con el emplazamiento de la zona de estudio (rodeada con un círculo rojo). Fuente: Proyecto Myas RC. (Martínez-Peña *et al.*, 2011)

La producción de *P.eryngii* en toda la comunidad es muy abundante, ascendiendo a 2340,4 toneladas al año que es recolectada por población recolectora no comercial y únicamente superada por la especie *Lactarius deliciosus* (níscolo) con 2771,4 toneladas al año. Hay que sumar aquí la producción que queda en manos de los recolectores comerciales, unas 1981,9 toneladas al año más, que es, curiosamente, mucho menor que en el caso de *L.deliciosus* y *Boletus* spp. (Martínez-Peña *et al.*, 2007); por tanto *P.eryngii* se asocia a recolectores no comerciales y, el poco porcentaje que se comercializa, es cotizado, alcanzando el 4º lugar en importancia comercial (Martínez-Peña *et al.*, 2007).

Las praderas de estudio se encuentran en tierras segovianas. Un enclave mesetario de clima mediterráneo frío y abundancia de suelos con vocación agrícola, todo ello óptimo para la producción micológica de especies pratenses como *Pleurotus* spp. (Martínez-Peña *et al.*, 2011). La singularidad del territorio es la coexistencia de dos paisajes, que desde el punto de vista geográfico-paisajístico pueden catalogarse de la siguiente manera: Extensas llanuras arenosas, con líneas de chopos marcando riberas y caminos, salpicadas de enormes extensiones de pinares (sobre todo en las comarcas de Cuellar, Coca y Santa Mª de Nieva). La otra catalogación paisajística atiende a laderas de Sierra, con densos y abundantes bosques en la parte meridional (Martínez *et al.*, 1998). A rasgos muy generales se puede dividir la provincia en tres zonas seteras según el tipo de cosechas de hongos que se producen (Martínez *et al.*, 1998):

-Zona de Cuellar, Coca y Cantalejo: Grandes productoras de níscolos y con gran aprecio hacia especies como los pucheruelos (*Paxina leucomelas*), turmas (*Rhizopogon roseolus*), bonetes (*Helvella monachella*) y las mandarrias (*Morchella esculenta*) principalmente.

-Zona de Sepúlveda, Boceguillas y Riaza: Estas tierras son grandes productoras y consumidoras de seta de cardo (*Pleurotus eryngii*) que suelen dirigirse a restaurantes burgaleses, segovianos y madrileños. También se cosechan enormes cantidades de níscolo (*Lactarius deliciosus*) con destinos comerciales de Valencia, Zaragoza, Murcia y

Barcelona. Las setas que se suelen consumir también son los champiñones silvestres (*Agaricus campestre*) y las senderillas (*Marasmius oreades*).

-Zonas de la sierra: Estas comarcas son grandes productoras de Boletos (*Boletus edulis* y *B.pinicola*) cuyos destinos comerciales más generales suelen ser Cataluña y Francia.

Existen zonas truferas privadas por las cercanías a Cedillo de la Torre pero el género *Tuber* no es un hongo que se recolecte por costumbre en la zona (Martínez *et al.*, 1998).

Más concretamente, el estudio se ha llevado a cabo en la región Nordeste de la provincia, enclave dónde confluyen las provincias de Soria y Burgos y la Comunidad Autónoma de Madrid, a las faldas de la Sierra de Ayllón. La comarca tiene una altitud en torno a los 1.000 metros sobre el nivel del mar. Sus principales pueblos son Sepúlveda, Ayllón, Boceguillas, Riaza y Prádena entre otros, todos ellos con fuerte producción micológica. Sus territorios se incluyen en el programa de previsión de producción micológica Mycodata. El programa muestra las principales zonas de producción de hongos silvestres comestibles y anuncia periódicamente el pronóstico atendiendo a los últimos datos meteorológicos. En la figura nº 3 se muestran una consulta concreta a este sistema de información geográfica donde se aprecia la cantidad de territorio productor de hongos que existe en la zona de estudio.

De las tres zonas seteras vistas anteriormente en las que se cataloga la comarca, es la zona de estudio la más destacada en *P.eryngii*. No existen demasiados datos de producción de este hongo exclusivos para la zona y, los que existen, aparecen en diferentes unidades de estimación lo que dificulta la comparativa: entre 3 y 10 Kg/día por recolector (Martínez *et al.*, 1998) ó 27 Kg por temporada, recolector y hectárea (Tobar, 2008).

Fig.3. Consulta al sistema de información geográfica Micocyl de la Junta de Castilla y León. Se obtiene información sobre la producción micológica del municipio de Boceguillas (Segovia) dónde se ubican las finca de muestreo y la estimación diaria. Fuente: www.micocyl.es Fecha de consulta: 19/10/2014.

Como vemos, existe legislación autonómica de ordenación del aprovechamiento micológico en esta zona. Se integran estos municipios en la unidad de gestión micológica de la Sierra de Ayllón. No todo el territorio está regulado, únicamente los montes recogidos en un listado que publica la Junta de Castilla y León, basándose en su condición de montes ordenados.

Las tres fincas de muestreo establecidas para desarrollar el trabajo se encuentran en el municipio de Boceguillas. En la figura nº 4 se aprecia que esta parte del hábitat natural de *P.eryngii* (poligonada con negro) queda fuera de regulación del aprovechamiento micológico (poligonado con rojo).

Para recolectar hongos silvestres en la zona regulada es necesaria una licencia y, dicha zona, estaría limitada en cantidad diaria de recogida, especies, personal, controles sanitarios y demás normativa referente, no aplicables fuera de este polígono rojo. Puesto que la zona de aprovechamiento micológico gestionado siempre coincide con montes ordenados, en este caso de pino silvestre, la seta que abunda en este hábitat es el *Lactarius deliciosus* o níscalo y no la especie objeto de este estudio. *P.eryngii* crece sobre todo en terrenos

calizos, sobre eriales, baldíos, espacios perdidos, que llevan unos años sin cultivar, sobre crestas y cuevas, sobre parameras calcáreas, aprovechando siempre la materia orgánica acumulada y, especialmente, la del tronco del cardo corredor, al que frecuentemente aparecen asociadas, alimentándose de su materia en descomposición o de sus raíces (Junta de Castilla y León, 2014).

La gestión micológica de este municipio es un ejemplo que se repite y deja de manifiesto que la mayor parte de la superficie productiva de *Pleurotus eryngii* queda fuera de los cálculos de producción, estadísticas y demás bases de datos que se asocian a su gestión (Martínez *et al.*, 1998; Tobar, 2008).

Fig.4. Fotografía satélite del municipio de Boceguillas (Segovia) dónde se ubican las fincas de muestreo. Las estrellas amarillas marcan la localización de las fincas. El polígono rojo delimita la superficie de aprovechamiento micológico regulado que corresponde al monte ordenado cercano y el polígono negro la zona de aparición de *Pleurotus eryngii*.

1.3 Ecología del hongo *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué! (1872) var. *eryngii*.

Reino Fungi, Grupo Macromicetes, División Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden Agaricales, Familia Pleurotaceae, género *Pleurotus* y especie *P.eryngii*, es la taxonomía completa del hongo en estudio, figura nº 5 (Mycobank, 2014).

Fig.5. Micelio de *Pleurotus eryngii* desarrollado en laboratorio.

El hábitat natural de esta especie es el bioma Mediterráneo; clima continental y mediterráneo húmedo. Citada como especie frecuente en Argelia, Chipre, Grecia, Italia, Israel, Francia, Marruecos, Túnez y España (Bresadola, 1911; Offner, 1929; Hennings, 1991). En la Península Ibérica, son las provincias centrales de suelos calizos, pero no exclusivamente pues soportan también las arcillas silíceas, las zonas más productivas.

Pleurotus eryngii es un hongo ectomicorrícico asociado al *Eryngium campestre* que crece en los eriales y baldíos de terrenos pastoreados, cañadas y parameras. El micelio de este hongo se alimenta de las raíces secas del mencionado cardo. Especie ecológicamente frágil, que requiere que la

superficie del sustrato mantenga una capa de cobertura para que la luz que le riega no sea directa y para que se amortigüen los cambios bruscos de temperatura y humedad (Junta de Castilla y León, 2012-2014).

Temperatura óptima para el crecimiento del micelio: 24°C

Temperatura óptima en la fructificación: 14°C

Humedad ambiente en la fructificación: muy alta, cercana al 80%

Humedad edáfica en la fructificación: muy alta, cercana a la Capacidad de campo. (Calvo-Bado, 2001; Jiménez, 2009).

La descripción de los carpóforos¹⁰ atiende a un sombrero carnoso, primero de superficie superior convexa, pero en seguida abierta aplanada, e incluso algo hundida, con el borde más o menos replegado y desigual. De 2 a 12 cm de diámetro y color pardo en diferentes tonos, pudiendo presentar algunas zonas oscuras y otras ocreas o pálidas, algunos ejemplares son amarillentos. Las láminas de la cara inferior son radiales y decurrentes (bajan adosadas al pie), blancas y luego de color crema. El pie es macizo, lleno, algo fibroso, generalmente descentrado blanquecino ó pálido. La esporada es blanca de 10-12 x 5-6 micras. Su sabor suave, dulce y aromático. Es una de las setas más emblemática y tradicional de Castilla y León (Junta de Castilla y León, 2012-2014).

La temporada de recolección de los carpóforos se divide en dos: la temporada otoñal: Desde mediados de octubre, cuando la humedad edáfica es permanente, hasta mediados de diciembre, cuando los hielos son continuos. La parte vegetativa del cardo asociado está seca. Esta es la verdadera temporada de seta de cardo, nombre común de los carpóforos de este hongo, pues existe una continuidad en la producción. La temporada primaveral: Puede durar desde abril hasta mayo y se trata de una producción discontinua de carácter

¹⁰ Cuerpo fructífero de los hongos epígeos comúnmente llamado seta.

esporádico tras lluvias abundantes primaverales. Muy comunes aquí las floradas¹¹ (Pérez del Amo, 2007).

Una variedad de esta especie, propia de las parameras calizas de esta comarca que se encuentra sobre todo en primavera, es *P.eryngii* var. *nebrodensis*, que crece asociada a otras plantas, comúnmente llamadas cañalejas o llampazos (*Thapsia villosa*, *Laserpitium gallicum*, *Ligusticum lucidum*, *Ferula communis*, etc.) todas ellas familia de las Umbelíferas que crecen también en pastizales y cercanías de apriscos y poblaciones (Pérez del Amo, 2007).

1.4. Daños y beneficios generales que puede producir la fauna asociada a los hongos silvestres

Se llaman animales fungívoros a todos aquellos que consumen intencionadamente algún tipo de material fúngico como micelio, carpóforos, esporas etc.

Existen distintos grados de palatabilidad, que define un tipo de consumo diferente según la especie. Muchas veces los hongos reaccionan con mecanismos de defensa que han desarrollado para repeler a estos animales fungívoros; otras veces, la micofagia animal ha sido aprovechada para la propia dispersión fúngica, así, hay hongos que utilizan insectos (Diptera, Collembola, etc.) para propagar sus esporas. Un ejemplo extremo es el hongo *Phallus impudicus*, dotado de un olor putrefacto capaz de atraer a numerosas moscas (Martínez-Peña, 2003). Algunos autores señalan que la forma más importante de dispersión se basa en la adherencia de las esporas a la superficie de los animales (Shaw, 1992), radicando aquí el principal beneficio entre las relaciones hongo-fauna.

¹¹ Los aficionados a la micología llaman así al fenómeno explosivo de fructificación de setas, que acompaña a unas lluvias y temperaturas óptimas para la producción de cierta especie de hongo, y que genera cosechas muy abundantes.

Estudios sobre el consumo de hongos incluidos en las dietas de la fauna mamífera del entorno (Martínez-Peña, 2003) proporcionan datos orientativos sobre los daños que pueden llegar a generar: para un monte soriano con un sistema silvopastoral con presencia de ganado bovino, ovino y caballar y especies cinegéticas de jabalí, corzo y ciervo principalmente, el consumo de *Boletus* spp, *Russula* y *Bovista* sumaba al menos un 4,7%.

No se han encontrado referencias sobre la dieta de animales domésticos que pastorean en el hábitat del hongo en estudio. Además, las praderas de muestreo están cercadas y exentas de pastoreo por lo que, en este trabajo, se prescindirá de ganadería y fauna cinegética y se trabajara con los daños generados por la entomofauna directamente asociada al hábitat del hongo.

Existen referencias sobre insectos que generan daños en *P.eryngii*: por un lado se encuentran referencias al consumo de partes del micelio que merman la población, ácaros principalmente y también hongos competidores y antagonistas, como pueden ser *Trichoderma viride*, *T.harzianum* y hongos del género *Mucor* principalmente. etc. (Jiménez, 2009). Otros como arácnidos, coleópteros (Amaringo-Cortegano, 2013), gasterópodos y colémbolos (Tobar *et al.*, 2008) que generan daños superficiales en los carpóforos, depreciando las recolecciones. Hay un registro sobre nematodos que provocan tumores en forma de ovillos en la zona de las hifas (Tsuda, 1996).

Hay dípteros nematóceros que realizan parte de su ciclo biológico en el interior de ese y otros hongos, principalmente instalándose en hongos macromicetos. Se presenta así un parasitismo con una fase de patogénesis¹² capaz de generar daños internos en la estructura de los carpóforos. Las larvas encuentran en el carpóforo alimento y un ambiente propicio para su desarrollo, que además habrá de ser rápido: la vida media de las setas de Agaricales ha sido estimada en unos siete días (Lacy, 1984). Estas larvas presentes en el interior de las setas pueden plantear problemas para su comercialización como el rechazo de hongos agusanados o bajadas de precios (Tobar *et al.*, 2008).

¹² periodo en el cuál el patógeno se encuentra en el hospedante con vida. Fase del ciclo en la que el patógeno permanece asociado con los tejidos vivos del hospedante (la seta).

Los controles de calidad de las setas silvestres se regulan recientemente, siendo en la mayoría de sus puntos a valorar, reconocimientos visuales de control veterinario: “Estar exentas de artrópodos, gusanos o moluscos y de partes o excrementos de cualquiera de ellos..” (BOE, R.D. 30/2009, del 16 de enero). El seguimiento de estos fenómenos, a veces considerados plaga, y su posible relación con parámetros bióticos y abióticos resulta necesario para poder predecir la calidad interanual de los productos micológicos.

Los dípteros cuyos hábitos reproductivos se asocian a los hongos pertenecen a la superfamilia Sciaroidea, destacando las familias Sciaridae y Mycetophilidae (Fungivoridae) (Hanski, 1989). No pasan desapercibidos como se puede comprobar en las siguientes citas:

“Son las moscas y mosquitos insectos de dos alas, conocidos por todos. Sus larvas, que no tienen patas, causan graves daños al devorar los hongos (...) Raro es el cultivo de champiñón que no se ve afectado por ésta plaga. En cuanto a las setas silvestres es desesperante para el aficionado a tales alimentos, encontrarse gran número de ejemplares parasitados, cosa que suele ocurrir con demasiada frecuencia.” (Rollán, 1989).

“En Escocia, un tercio de las recolecciones son infestadas por dípteros” (Kalamees, 1979).

“Las más importantes plagas de hongos silvestres son, a parte de los ácaros y nematodos, los dípteros nematóceros” (Rinker, 1984), pero, a pesar de las moscas, sólo los esciáridos con larvas masticadoras son capaces de devastar las cosechas” (Binns, 1980).

Sin duda, todo aficionado a la micología es, al menos, conocedor de este tipo de parásitos. Los consumidores habituales, al presentárseles esta situación, tienen dos opciones: ignorar el asunto y, confiando en su tolerancia

estomacal, consumir el producto ó desechar los ejemplares agusanados como el que se muestra en la figura nº 6.

Fig.6. Ejemplar de *Agaricus marzoulus* comprado en comercio especializado en setas silvestres frescas y que resultó estar parasitado por un nematócero fungívoro.

El daño físico que producen estos insectos al alimentarse, abre rutas de contaminación secundaria, dando una oportunidad a la colonización de patógenos como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., ambos oomycetos, ó *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp., como hongos parásitos (Gardiner, 1990; Jarvis *et al.*, 1993). Implica, además, el porte de ácaros y bacterias como *Pseudomonas tolasii* (Wong y Preece, 1980). Los nematodos, en su mayoría parásitos obligados, invaden los huevos y las larvas de estos endoparásitos para reproducirse. De forma directa pueden producir daños en el micelio (Vedder, 1979), como ya se comentó anteriormente. De forma indirecta, pueden ser también vectores de contaminaciones en el carpóforo y el hongo al completo (Abawi y Chen Jianjun, 1998).

En el estudio se busca llegar a conocer esta entomofauna asociada, definir su etología y ecología con la mayor precisión posible, centrándonos fundamentalmente en *Pleurotus eryngii*. Se aportan nociones para el control de parasitaciones que puedan mejorar la calidad de las cosechas naturales de esta seta, pudiendo aplicarse a otras especies silvestres comestibles que, como también se pone de manifiesto en este estudio, pueden presentar las mismas depreciaciones.

1.5 El control de la entomofauna asociada a daños en las setas silvestres.

La ecología de los dípteros fungívoros en su fase adulta no se aborda en este estudio. Parece difícil asumir comunidades o gremios de hábitos gregarios cuando lo común es la polifagia (Hanski, 1989). Uno de los géneros de hongos que más polífagos registra es el de los agaricales y se ha demostrado que comunidades de hasta 184 nematóceros parásitos de este hongo adoptan una dinámica ordenada que podría identificarse como gremios. En concreto la ecología de la familia Mycetophilidae, principal implicada en las parasitaciones resultantes, fue considerada con aptitudes sociales (Russel-Smith, 1979) cosa que facilita un tratamiento de control.

Los insectos fungívoros pueden estimarse como un grupo análogo de las plagas de insectos en el hábitat de la agricultura (Hanski, 1989). A diferencia con grupos de insectos anteriores, en el hábitat de los fungívoros, existen demasiadas imperfecciones espaciales y temporales del recurso que implican la fuerza primaria de selección de los polífagos y exponen a las poblaciones a un amplio abanico de químicos. La industria de los pesticidas ya se ha dado cuenta de resistencias que presentan ciertas especies de fungívoros (Georghio, 1986). La resistencia a tóxicos también es una práctica de común desarrollo en la competitividad por encontrar hospedantes. La polifagia unida a una anormalmente larga diapausa sugiere adaptaciones para la supervivencia únicas de los nematóceros fungívoros (Hanski, 1989).

Una vez estudiada la importancia de los daños producidos por la entomofauna asociada a las poblaciones de *Pleurotus eryngii* y aumentados los conocimientos sobre ésta entomofauna, se abre una reciente línea de investigación, basada en el control biológico de los principales parásitos. Actualmente se trabaja en la búsqueda de aromas atractivos que inducen la puesta de los dípteros en la seta de cardo. Se presenta el Análisis de aromas por micro extracción en fase sólida llevado a cabo y sobre el que se sigue trabajando.

1.6 Referencias bibliográficas en el Capítulo 1

Abawi, G. S., Jian-Jun, C., Barker, K. R., Pederson, G. A., y Windham, G. L. (1998). Concomitant pathogen and pest interactions. *Plant and nematode interactions, Agronomy series*, 36, 135-158.

Amaringo-Cortegano, C. A., Vargas-Isla, R., de Moraes, J. W., y Ishikawa, N. K. (2013). Artrópodos asociados a seis especies de hongos comestibles de ocurrencia natural en Manaus, Amazonas, Brasil. *Biota Amazônia*, 3(3), 54-63.

Anderson, C. Farrar, S. (1994). King Eryngii. (On-Line). Actualizada: desconocido. [Fecha de consulta: 02/02/2014]. Disponible en: <http://www.goldengourmetmushrooms.com/oyster.html>.

Bresadola, G. (1911). Fungi congoenses. *Annales Mycologici*, 9, 266-276.

Binns, E. S. (1980). Field and laboratory observations on the substrates of the mushroom fungus gnat *Lycoriella auripila* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology*, 96(2), 143-152.

Boa, E., 2004. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. *Food & Agriculture Org.*, 17, 1-5.

BOE (2009) Real Decreto 30/2009, de 16 de enero, por el que se establecen las condiciones sanitarias para la comercialización de setas para uso alimentario. *Boletín Oficial de Estado*, 20, de 23 de enero de 2009, 7861 a 7871.

Calvo-Bado, L. (2001). Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Sánchez, J., Roise, D.(Eds). Editorial LIMUSA, México. pág, 71-79.

De Frutos Madrazo, P., Peña, F. M., & Laleona, S. E. (2008). Propuesta de ordenación comercial de los aprovechamientos micológicos a través de lonjas agrarias: análisis económico y financiero para la provincia de Soria. *Revista española de estudios agrosociales y pesqueros*, 217, 73-104.

De Frutos Madrazo, P., Martínez-Peña, F., & Esteban, S. (2012). Edible wild mushroom tourism as a source of income and employment in rural areas. The case of Castilla y León. *Forest Systems*, 21(1), 81-98.

Echeverría, C. y Ruminot, M. (2004). Estudio de mercado. Documento interno. Proyecto FONDEF D02I1003. Chile, 49.

FAO, (2001). Resource assessment of non-wood forest products: experience and biometric principles. By J.Wong, K. Thornber & N. Baker. *Non-wood Forest Products 13*. Rome. 126.

García, M. (1998). Cultivo de setas y trufas. *Ediciones grupo mundi-Prensa*, Madrid. Barcelona. México. 217.

García, O.; Iácono, O. (2005). Producción y comercialización de hongos comestibles: gírgolas. (On Line). *Agroalternativo*. Actualizada: 09/10/2005. [Fecha de consulta: 07/03/2013]. Disponible en: <http://www.agroalternativo.com.ar/docs/girgolasinfo.htm>

Gardiner, R. B., W. R. Jarvis and J. L. Shipp, (1990). Ingestion of *Pythium* spp. by larvae of fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology*, 116, 205-212.

Georghio, G.P. (1986). The magnitude of the resistance problem. National Academy of Sciences. *Pesticide resistance: Strategies and management* National Academy Press. Washington, 14-43.

Hanski, I. (1989). Fungivory: fungi, insects and ecology. *Insect-fungus interactions*, 25-68.

Hennings, P. (1991). Fungi Indiae orientalis: I, II. *Friedlander y Sohn*, Berlin, 269.

Jarvis, W. R., Shipp J.L. y Gardiner, R.B. 1993. Transmission of *Pythium*

aphanidermatum to greenhouse cucumber by the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology*, 122, 23-29.

Jiménez-Ramírez, J.R. (2009). Conferencia sobre *Pleurotus eryngii*. Sociedad micológica de Madrid (On Line). Actualizada: 09/09/2004. [Fecha de consulta: 07/010/2014]. Disponible en:

<http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias19.html>

Junta de Castilla y León (2012-2014). Patrimonio Gastronómico (On Line). Actualizado: 01/01/2014. [Fecha de consulta: 01/02/2014]. Disponible en:

http://www.patrimoniogastronomico.com/productossilvestres_c.shtml?idboletin=131&idseccion=330&idarticulo=3393.

Kalamees, K. (1979). The role of fungal groups in the structure of ecosystems. Eesti NSV TA Toim., *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Biology, ecology*, 28(3), 206–213.

Lacy, R.C. (1984) Predictability, toxicity and trophic niche breadth in fungus feeding *Drosophilidae* (Diptera). *Ecological Entomology*, 9, 43-54.

Martínez, A., Oria de Rueda, J. A., y Martínez, P. (1998). Estudio sobre la potencialidad de los diferentes usos del bosque para la creación de empleo y actividad económica en el medio rural de Castilla León. *La producción de mayor potencialidad: hongos silvestres comestibles*. Junta de Castilla-León y Fondo Social Europeo, Palencia, 25-29.

Martínez Peña, F. (2003). Producción y aprovechamiento de *Boletus edulis*. Bull.: Fr. en un bosque de *Pinus sylvestris* L. Bases para la ordenación y valoración económica del recurso micológico forestal. *Serie técnica de la Consejería de Medio Ambiente*. Junta de Castilla y León, 134.

Martínez Peña, F. y García Cid, R. (2003). Ordenación del recurso micológico en la comarca de Pinares de Soria-Burgos. *Actas del XII Congreso Forestal Mundial*. Québec. Canadá, B, 319-320.

Martínez - Peña, F., Gómez Conejo, R., Ortega-Matínez, P. (2007). MICODATA - Sistema de Información Geográfica sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico en Castilla y León (On-line). Actualizado: 10/03/2014. [Fecha de consulta: 15/03/2014]. Disponible en: <http://www.micodata.es>

Martínez-Peña, F., Oria de Rueda, J. A., y Ágreda, T. (2011). Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y León. *Serie Técnica de la Junta de Castilla y León*, 45.

Mycobank (2014). Home Page (On Line). Actualizado: 24/05/2014. [Fecha de consulta: 10/03/2009]. Disponible en:
<http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank>

Mushworld. (1998). Home Page (On Line). Actualizado: 10/05/2004. [Fecha de consulta: 15/03/2007]. Disponible en: <http://www.mushworld.com>

Offner, R. (1929). Vaincre. *Figuière*, Baron, France, 235-240.

Pérez del Amo, C.M. (2007). Seta de cardo, Cardencha. Grupo Cultural Micológico verpa. Gobierno de La Rioja (On Line). Actualizado: 12/02/2014. [Fecha de consulta: 15/05/2010]. Disponible en:
https://www.larioja.org/npRioja/cache/documents/451907_PleurotusEringii.pdf

Pilz, D y Molina, R. (2002). Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management*, 155 (81-3), 3-16.

Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A., & Xoconostle-Cázares, B. (2008). Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*, 62(3), 425-436.

Rinker, D. y Snetsinger, R. J. (1984). Damage threshold to a commercial mushroom by a mushroom-infesting phorid (Diptera: Phoridae). *Journal of economic entomology*, 77(2), 449-453.

Roig, B. (2005). Estudio descriptivo de la demanda española de turismo en casas rurales. *Revista española de estudios agrosociales y pesqueros*, 207, 181-196.

Rollán, M.G. (1989). Plagas y enfermedades del champiñón y las setas. *Boletín del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid*, 32-50.

Russel-Smith, A. (1979). A study of fungus flies (Dipteral Mycetophilidae) in beech woodland. *Ecological entomology*, 4(4), 355-364.

Shaw, P.J. (1992). Fungi, fungivores and fungal food webs. In: Carroll, G.C., Wicklow, D.T. (Ed.), The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. *Marcel Dekker, Inc., New York*, 295-310.

Tobar, V. (2008). Estudio de la entomofauna asociada a las setas silvestres y ecología del principal parásito de la seta de cardo (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué!l). *E.T.S.I.M Universidad Politécnica de Madrid*, 15, 57-59, 138-142.

Tobar, V. Notario, A. Castresana, L. (2010). *Tarnania fenestralis* (Diptera: Micetophilidae) associated with *Pleurotus eryngii*. *Forest Systems* 19(3): 299-305.

Tsuda, K., Kosaka, H., Futai, K. (1996). The tripartite relationship in gill-knot disease of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr) Kummer. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 74 (8), 1402-1408.

Vedder, P. (1979). Cultivo moderno del champiñón. Madrid, España. *Ediciones Mundiprensa*, 373 .

Wang, Y., Wan, C., Yang, J., Chen, J., Yuan, T., y Zhao, J. (2010). Collection of group characteristics of *Pleurotus eryngii* using machine vision. In *Computer and Computing Technologies in Agriculture III* , Springer Berlin Heidelberg, 98-103.

Wong, W.C., Preece, T.F. (1980). *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: a note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England, *Journal of Applied Bacteriology*, 49, 305–314.

Capítulo 2. Material y métodos.

Placas

Fibrillas

Escamas

Verrugas

Pruinosa/Granulosa

Areolada

Resquebraja

Vilosa

Zonado

Para poder cubrir los objetivos propuestos en el trabajo se han seguido dos líneas de investigación. Una de ellas se basó en cuantificar los daños que provoca la entomofauna asociada a *Pleurotus eryngii*. Se adelanta que, el principal daño, se ha asociado a las especies que parasitan los carpóforos. Se extraen datos de producción, abundancia de parasitaciones en el producto y cómo éstas pueden llegar a depreciar la cosecha. Se realiza además un estudio de mercado que refleja la forma en que los parásitos pueden llegar finalmente al consumidor. La otra línea desarrolla estudios encaminados al conocimiento entomológico de las especies parásitas encontradas. Se determina su etología, ciclo biológico, potencial biótico y daños, captura de adultos e identificaciones taxonómicas. Se describen por primera vez las larvas de estos parásitos así como las distinciones taxonómicas de sus dos últimos estadios.

Un total de nueve estudios que definen diferentes aspectos de la parasitación:

- ✓ Prevalencias de parasitación.
- ✓ Ensayo de control de dípteros por atrayentes.
- ✓ Presencia de parásitos en setas comercializadas. Estudio de mercado.
- ✓ Respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial.
- ✓ Cría de larvas para la obtención de insectos adultos en laboratorio.
- ✓ Estudio de la puesta del parásito.
- ✓ Cuarentena de carpóforos aparentemente no parasitados.
- ✓ El estudio taxonómico de las principales especies y su identificación.
- ✓ Por último, los análisis de ejemplares parasitados mediante observaciones bajo lupa binocular y microscopio. Observaciones de los movimientos de las larvas, análisis biométrico de cápsulas cefálicas, observaciones de las galerías, zonas de pupación y muda. También se realizan preparaciones de larvas y se describen los dos últimos estadios de las larvas de los principales parásitos resultantes.

Una vez estudiada la importancia de los daños producidos por la entomofauna asociada a las poblaciones de *Pleurotus eryngii* y aumentados los conocimientos sobre ésta entomofauna, se abre una reciente línea de investigación, basada en el control biológico de los principales parásitos. Se realiza un análisis de aromas por microextracción en fase sólida sobre el que se sigue trabajando.

2.1 Definición y características de la zona de estudio.

El trabajo de campo se lleva a cabo durante los años 2006 a 2008.

El equilibrio sucesional, definido como el cambio dirigido en la composición, abundancia relativa y distribución espacial de las especies de una comunidad, puede ser aplicado tanto a plantas como a hongos (Frankland, 1992). Así, del mismo modo que se producen estadios sucesionales en las comunidades vegetales, también ocurre con las micocenosis asociadas, habiéndose descrito cambios importantes en la estructura de la comunidad durante el desarrollo de una estación (Le Tacon *et al.*, 1984; Garbaye y Le Tacon, 1986; Martínez-Peña y Fernández Toirán, 1997; Trofymow *et al.*, 2003; Fernández Toirán *et al.*, 2006).

Paralelamente, en el suelo se producen notables variaciones, tanto en el nivel de nutrientes de las raíces (Strullu, 1991), como en la temperatura (Ballard, 2000), la capacidad de retención de agua y la porosidad (Jones *et al.*, 2003). Todos estos cambios tienen una influencia notable en este ecosistema por tanto, en todos los procesos ecológicos en los que se ven implicados.

Éstos factores de cambio ya los reflejó Martínez Peña en su tesis doctoral sobre las variaciones en la fructificación de hongos macromicetes (Martínez-Peña, 2008). A sumar estos factores al propio dinamismo de una pradera, hábitat natural del hongo en estudio.

Por todo ello, estudiar un ecosistema tan cambiante e intentar entender los papeles intervinientes pasa por una correcta elección de las unidades de muestreo, el correcto diseño de los diferentes estudios que se realizarán y todo ello preservando el lugar sin alteraciones relevantes.

Para tener la certeza de que se estudia la entomofauna asociada a este hongo, se han elegido poblaciones naturales de *Eryngium campestre* ectomicorrizado de forma espontánea por *Pleurotus eryngii* dentro de su principal área de distribución. En este enclave y en estos años donde se presentaron cosechas regulares y abundantes, las asociaciones de vegetal, hongo y fauna no deberían, a priori, condicionarse o influirse por factores externos.

Las dificultades intrínsecas y los resultados del estudio difieren por tanto de las investigaciones sobre plagas o fauna asociada a daños en cultivos de hongos artificiales así como los métodos de control bajo ambientes controlados, estudios más extendidos que el que aquí se presenta.

Se trata de un enclave con usos del suelo agrícolas, cereal de secano, abandonados en 1993 para dar paso a las diferentes etapas seriales propias de los baldíos de suelos pardos sobre depósitos alóctonos.

De titularidad privada, acotadas y excluidas de caza, pastoreo y aprovechamientos comunales. Localizadas en el término municipal de Boceguillas (Segovia). Durante la recogida de datos el hábitat permanece sin alteraciones naturales ni artificiales, ausencia de riegos, siegas ni laboreos. Se protege también el acceso para evitar aprovechamientos, pastoreo o cualquier otro factor ajeno al estudio.

La orografía de la zona es de pendiente, parte baja de la ladera norte de la Sierra de Ayllón (Sistema Central) con orientación de su cordal principal O-E y cordales subsidiarios N-S, con un pie de monte a 700 m.s.n.m. y con origen un plegamiento. La zona de estudio se encuentra bajo el Puerto de Somosierra,

siguiendo una dirección norte 17 Km. Pocos kilómetros más hacia el norte se presenta la meseta castellano-leonesa. Orientación y exposición de solana. Bioclimáticamente pertenecería al piso supra mediterráneo con ombroclima subhúmedo. Según la clasificación de Allue Andrade (Allue Andrade, 1997), pertenece a la Subregión Fitoclimática IV (VI): Mediterráneo subhúmedo de tendencia centroeuropea, y la Productividad Potencial Forestal, sería de Clase II y Clase III (Gandullo y Serrada, 1987). Los datos climáticos más importantes son la Precipitación media anual de 400 a 800 mm con días con presencia de temperaturas menor a 0,0 °C entre 90 y 120, siendo enero el mes más frío con temperaturas medias de 4°C y junio el más cálido con 20 °C de media. La Productividad Potencial Forestal es de Clase II (Tierras que presentan limitaciones débiles para el crecimiento de bosques productivos) y de la Clase III (Tierras que tienen limitaciones moderadas para el crecimiento de bosques productivos) (Gandullo y Serrada, 1987); con una productividad potencial del bosque de 6m³ /ha y año. La edafología asignada por los mismos autores sería de *Suelos pardos sobre depósitos alóctonos pedregosos*.

Se trabaja en tres fincas de superficies 0,3 ha, 1.45 ha y 0.92 ha. Para algunos de los estudios realizados se recolecta en toda la superficie y, para otros, únicamente en las parcelas instaladas. Las definiciones de cada muestreo se detallan en los siguientes apartados y dependen de los objetivos de cada estudio.

Las características concretas de cada una de las fincas y sus parcelas de muestreo se detallan a continuación (Fig.7 y Fig.8):

Superficie total de recolección: 0,3ha = 3.144 m ²	Superficie de la finca 1. : 0,125ha = 1.250m ²	U.T.M.: X-447476, Y-4575010	PH: ÁCIDO
Altitud: 1010 m.s.n.m	Orientación: SOLANA	Otras características: RIEGO ESTIVAL	Aprovechamiento: MICOLÓGICO
Serie de vegetación correspondiente según RIVAS MARTÍNEZ, S. (1987 a; 1987b): <i>Serie supra-mediterránea carpetano-ibérico-leonesa y alcarreña subhúmedo silicícola de Quercus pyrenaica o roble melojo. (Luxulo fosteri-Querceto pyrenaicae sigmetum)</i> Vocación Potencial: robledales de melojo. <i>18.a. Faciación típica o subhúmeda.</i>			
Uso histórico del suelo; Mapa de cultivos y aprovechamientos de M.A.P.A (1980): <i>3.9. Pastizal Matorral</i>			
Geología: MIOCENO			

Fig.7. Características y localización de la finca de estudio "finca 0". Boceguillas (Segovia).

Superficie total de recolección: 1:1,445ha / 2: 0,920ha	Superficie de la fincas 2. y 3.: 0,125ha =1.250m ²	UTM: X-446650, Y-4576050 X-446550, Y-4576000	PH: BÁSICO
Altitud: 1:910 y 2:900 m.s.n.m	Orientación: SOLANA- HUMBRÍA	Otras características: 1:SIEGA ALTA (2000)	Aprovechamiento : MICOLÓGICA
Serie de vegetación correspondiente según RIVAS MARTÍNEZ, S. (1987): <i>Serie supra-mesomediterránea castellano-alcarreño-manchega basófila de Quercus fagínea o quejigo. (Cephalanthero longofoliae- Querceto faginae sigmetum.)</i> Vocación Potencial: quejigares 19.b. <i>Faciación típica o supra-mediterránea.</i>			
Uso histórico del suelo; Mapa de cultivos y aprovechamientos de M.A.P.A (1980): 3.2. <i>Labor intensiva- barbecho semillado</i>			
Geología: NEOCRETÁCICO			

Fig.8. Características y localización de las fincas de estudio "finca 1" y "finca 2". Boceguillas (Segovia).

Las condiciones ambientales en las que se ha estudiado el hongo corresponden a las condiciones naturales del mismo, que se han dado en las propias praderas de estudio o que han sido reproducidas artificialmente para los estudios de laboratorio. Las temperaturas ideales de desarrollo son de 24°C para el crecimiento del micelio, 14 °C para que fructifique el hongo y una humedad ambiental alta, cercana al 80% acompañada de mucho agua retenida en el suelo, llegando a su capacidad de campo (Calvo-Bado, 2001; Jiménez, 2009).

2.2 Prevalencias de parasitación.

El primer estudio trata de determinar la presencia de insectos endoparásitos asociados al hongo en el campo, y valorar su influencia en las distintas recolecciones. Un objetivo indirecto es el de conocer la productividad por hectárea de *Pleurotus eryngii* en la zona de estudio.

2.2.1 Toma de muestras.

Para cuantificar la presencia de insectos en el interior de los carpóforos y hacer una estimación de su prevalencia de parasitación se ha diseñado un muestreo basado en la literatura de modelos de estimación de producción de hongos silvestres en su hábitat natural. Aplicando a estos resultados el índice de infestación que resulte en dichos muestreos se determinaran las prevalencias de parasitación y su importancia en las recolecciones.

La superficie de estudio es importante en el diseño muestral. Al disminuir el área total muestreada, la varianza en la estimación de la producción aumenta (Richardson, 1970). El área de muestreo es de algo mayor a dos hectáreas y media.

Las unidades de muestreo utilizadas en la estimación de producción fúngica corresponden a parcelas y transectos de diferentes formas y tamaños: existen propuestas de muestreo mediante transectos lineales permanentes que

se recogen cada cierto tiempo (Ohenoja, 1984) y este método es apoyado cuando se trata de hongos con producción de forma irregular o cuando existen cambios en la vegetación (Wilkins, 1939). Este tipo de muestreo pasa por líneas no superiores a cinco metros de ancho para minimizar los errores humanos (Parker-Rhodes, 1951). También se emplean los transectos lineales (Buckland *et al.*, 1993), las líneas de muestreo cruzadas (Warren y Olsen, 1964), los recorridos con un ancho de banda (Lämas y Fries, 1995) y grupos de muestreo (Thompson, 1990; Roesch, 1993). Estos muestreos se diseñan principalmente para formaciones boscosas y son estudios pioneros que se diseñaron para estimar la producción de hongos silvestres en el norte de Europa.

Los muestreos de hongos que crecen en formaciones homogéneas tienen literatura asociada a las parcelas rectangulares o cuadradas y de carácter permanente (Ammirati, 1987; Gardner y Malajczuk, 1988 y Hilton *et al.* 1989;) que se eligen por características similares de formación vegetal, presencia homogénea del hongo y condiciones geológicas e hidrológicas similares. El estudio se encuadraría en este supuesto.

En cuanto a la frecuencia de muestreo la literatura también es variada. Atiende a razones de alteración en la población de hongo pues, el carpóforo, es el cuerpo reproductivo del hongo y las prácticas culturales micológicas extraen el carpóforo formado y las esporas inmaduras en la mayor parte de los casos. Por tanto, la frecuencia y/o el método de muestreo se diseña para evitar dobles registros y no perder producción: hay autores que opinan que una recolección mensual durante tres años es suficiente (Hunt y Trappe, 1987), otros consideran adecuado cuatro repeticiones tres meses al año durante un año (Garbaye y Le Tacon, 1982), o bien dos o tres veces por semana durante los meses de agosto a octubre y semanalmente en julio y de octubre a diciembre durante cinco años (la temporada de setas en países centroeuropeos se adelanta hasta cuatro meses) (Richardson, 1970). Hay autores que recomiendan un periodo mínimo de muestreo de ocho años para poder caracterizar la producción en una zona determinada (Hering, 1966).

Si la frecuencia del muestreo es mayor que la media de vida de la especie muestreada, los carpóforos se recolectarán en estados senescentes o deteriorados (Mehus, 1986). Éste hecho aseguraría la no alteración en las poblaciones de hongo y su población parásita existiendo riesgo de incluir repeticiones en la parasitación de un mismo carpóforo que derivan en competición de puestas ó daños asociados al tiempo de senescencia y no a la entomofauna asociada y su forma de llegar al consumidor.

Para evitar este error en la estimación, hay autores que, previo al diseño de muestreo elegido, miden los ciclos vitales de las especies de hongo que les interesa (Richardson, 1970). Estos ciclos vitales pueden variar mucho según las condiciones, por ejemplo, Richardson (1970) estimó para *Lactarius rufus* un ciclo vital de 4-7 días, pero Hora (1959) lo estimó en 3-4 semanas. No se han encontrado registros sobre el ciclo vital del *P. eryngii* en su hábitat natural pero se estima en este estudio una duración no mayor a 7 días en ninguno de los casos. Se ha optado por muestreos semanales.

Por lo que respecta a cuándo realizar los muestreos, (Richardson, 1970) recomienda concentrar el esfuerzo de estimación entorno a los picos de producción, con el fin de reducir el error. Propone muestreos semanales en épocas de máxima producción y considera que, con dicha frecuencia, se puede registrar el 75% de la producción total, mientras que con una rutina quincenal tan sólo el 50%. Otros autores, muestreando únicamente en el periodo de máxima producción, obtienen valores mayores por encima de los obtenidos muestreando todo el periodo productivo (Hering, 1966). El objeto de este estudio exige realizar muestreos regulares durante toda la temporada de floración del hongo, que permita tomar datos de la dinámica poblacional tanto del él/los hospedadores cómo del hospedante.

La producción micológica oscila fuertemente de unos años a otros, debido a variaciones en el peso y número de los carpóforos de cada especie, pudiendo llegar en ocasiones a ser nula (Parker-Rhodes, 1951; Hering, 1966; Mehus, 1986). También se han observado grandes variaciones entre

estaciones en determinadas especies, principalmente en otoño y primavera. Así se ha observado que las variaciones anuales, en cuanto a biomasa relativa, son más acusadas en las producciones de primavera que en las otoñales (Luoma *et al.*, 1991). Se ha elegido una zona de producción natural de *P.eryngii* en años en los que se están registrando, de manera no precisa, buenos históricos de producción (Fig.9).

Fig.9. Histórico de producción de *Pleurotus eryngii* en las fincas de muestreo en el término municipal de Boceguillas (Segovia). Se reflejan los datos mensuales de la Temporada primaveral de setas (abril y mayo) y los datos mensuales de la Temporada otoñal de setas (octubre, noviembre y diciembre). Para los meses en los que el valor es de 0 significa que no hay datos registrados para ese mes de ese año.

No obstante, es interesante también para el estudio observar las fluctuaciones de los parásitos acorde o no con esta vecería que afecta al hongo asociado. Se analizarán puntos pico y valle de la producción del hongo en consonancia con sus parasitaciones. Los muestreos se han realizado durante el año 2006 y 2008 durante la temporada de producción otoñal (octubre, noviembre y diciembre).

Aunque el diseño de muestreo se apoya en diseños de estimación de la producción fúngica como referencia no es este el fin del estudio de la prevalencia de parasitaciones. Se deben estudiar de forma simultánea la presencia de carpóforos en la pradera, la presencia de entomofauna asociada

al hongo y su ecosistema conjunto. Estos datos centrados en los principales endoparásitos que se determinen representarán el índice de especialización de este vínculo.

Semanalmente se realiza la recolecta de las tres fincas en estudio y sus parcelas; solo se recogen carpóforos maduros que es lo que viene siendo la práctica común de “coger setas”. Un carpóforo maduro no atiende al tamaño sino al grado de evolución adquirido, Fig.10. Carpóforos con el sombrero y las láminas completamente desarrolladas: el borde del sombrero esta liso y desplegado totalmente y las láminas separadas desde su inicio de decurrencia con el pie hasta el borde del sombrero, Fig.11. Los tamaños orientativos de los carpóforos en el muestreo serían: Sombreros siempre mayores de 2 cm de diámetro, pesos de entre 16 y 20 gr (para un carpóforo tipo son 23 gr) y más de 3 cm de altura contada desde su punto de seccionado del pie, al ras del suelo. No se recolectarán carpóforos menores de éstos parámetros por no ser representativas de la producción, normalmente cuantificada en peso.

Fig.10. Fotografía de dos carpóforos recolectables y un no apto aún para la recolección.

Fig.11. Tamaños orientativos para la clasificación de carpóforos adultos recolectables.

Para extraer el carpóforo del medio también se atiende a estas prácticas comunes: con una navaja se secciona el pie unos milímetros por encima de su contacto con el suelo. Con una sección limpia para no levantar las hifas del hongo de la tierra se extrae, se coloca en una cesta de mimbre (ó material poroso) con el sombrero boca abajo para permitir la caída de esporas al suelo durante ésta práctica.

Se catalogan o normalizan en 4 grupos con un sencillo reconocimiento visual según su grado de agusanamiento generado por las larvas: carpóforos limpios de galerías, carpóforos poco, algo y muy agusanados.

- Ga 1.- Carpóforos “limpios de galerías”. Interior del pie y sombrero limpios (Fig.12).
- Ga 2.- Carpóforos “poco agusanados”. Menos del 25% de los tejidos internos del pie y sombrero con presencia de galerías (Fig.13).
- Ga 3.- Carpóforos “algo agusanados”. Entre el 25 y 50% de los tejidos internos del pie y sombrero con presencia de galerías y larvas. Se considera aquí el umbral de “ascos” para su consumo¹³ (Fig.14).
- Ga 4.- Carpóforos “muy agusanados”. Más del 50% de los tejidos internos del pie y sombrero con presencia de galerías y larvas (Fig.15).

Para ello se seccionan longitudinalmente y se observan sus tejidos internos (Fig.12-15). Los carpóforos considerados en este momento como limpios se someten en todos los casos a una cuarentena de 7 días para garantizar que realmente se encontraban limpios de puestas de parásitos.

¹³ Se ha determinado el grado de agusanamiento “Ga 3” como el umbral en el cuál los consumidores, si detectan esta cantidad de larvas y sus galerías en el interior de la seta, desecharían el ejemplar para su consumo. Para establecer este umbral se realizó una pequeña encuesta sobre 40 consumidores, mostrándoles ejemplares con este grado de agusanamiento. Este dato se ha considerado un nivel de daño que, junto al grado de agusanamiento inmediatamente superior “Ga4” suman el porcentaje de producción desechable en el momento mismo de su recolección.

Fig.12. Ejemplo de carpóforos con un grado de agusanamiento Ga 1 “limpios de galerías”.

Fig.13. Ejemplo de carpóforos con un grado de agusanamiento Ga 2 “poco agusanados”.

Fig.14. Ejemplo de carpóforos con un grado de agusanamiento Ga 3 “algo agusanados”.

Fig.15. Ejemplo de carpóforos con un grado de agusanamiento Ga 4 “muy agusanados”.

Los datos obtenidos, se recogen en estadillos en los que se incluye fecha de recolección, finca, dentro o fuera de la parcela, datos de recolección, grados de agusanamiento, y resultado de la cuarentena de los carpóforos limpios (Fig.16).

MUESTREO N° ----

Fecha. Parcela. Superficie

Parasitaciones en la Superficie Total			Parasitaciones en la Parcela		
		Nº carpóforo			Nº carpóforo
Ga1	Carpóforos limpios de galerías (pie y sombrero limpios)		Ga1	Carpóforos limpios de galerías (pie y sombrero limpios)	
Ga2	Carpóforos <u>poco</u> agusanados (0- 25% afectado)		Ga2	Carpóforos poco agusanados (0- 25% afectado)	
Ga3	Carpóforos <u>algo</u> agusanados (25-50% afectado)		Ga3	Carpóforos algo agusanados (25-50% afectado)	
Ga4	Carpóforos <u>muy</u> agusanados (+ 50% afectado)		Ga4	Carpóforos muy agusanados (+ 50% afectado)	
TOTAL Carpóforos afectados (%)					

Observaciones:

LOS CARPÓFOROS VISIBLEMENTE NO PARASITADOS (Ga1) SE INDIVIDUALIZAN Y SE SOMETEN A UNA CUARENTENA DE 7 días PARA VERIFICAR LA NO EXISTENCIA DE PUESTAS:

Nº carpóforos Ga1 fuera de parcela	Nº carpóforos	Nº carpóforos Ga1 dentro de parcela	Nº carpóforos
Fecha final cuarentena:	Con presencia de larvas	Fecha final cuarentena:	Con presencia de larvas
	Sin presencia de larvas		Sin presencia de larvas

Observaciones:

Fig.16. Estadillo de toma de datos en el Estudio de prevalencia de parasitación.

2.2.2 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se han desarrollado en el entorno SPSS 15.0.1 software (SPSS Inc, 2006) con el criterio estándar de probabilidad ($p < 0,05$) y considerando que la unidad muestral es cada una de las fincas de estudio.

Se obtienen unas series de datos de la producción de carpóforos semanal para cada pradera y otras de la cantidad de individuos que en su estado de recolección presentaban visiblemente larvas o síntomas de parasitación.

Puesto que todos los carpóforos aparentemente no parasitados se someten a cuarentenas, se tiene una serie de datos más que indica qué porcentaje de carpóforos aparentemente limpios de parásitos sí resultan estar contaminados. Para el cálculo de las prevalencias de parasitación se debe tener en cuenta estos últimos datos. Para comprobar si los datos provienen de una distribución normal se someten al análisis de una variable y, posteriormente, realizando a esta serie de datos un gráfico de probabilidad así como los análisis numéricos de Sesgo Estandarizado y Curtosis Estandarizada (Lawrence, 1997). Finalmente se indican intervalos de confianza para la media no siendo significativo mostrar los intervalos de la desviación estándar. Al mismo procedimiento se somete la serie de datos de porcentajes de infestación y de número de carpóforos recolectados.

Se eliminan los puntos extremos detectados si se trata de causas asumibles o explicables debidamente justificadas (un punto extremo fue detectado y descartado del análisis).

Con todo ello se determina un intervalo de confianza para la media y otro para la desviación estándar de la prevalencia de parasitación de endoparásitos para cada una de las praderas.

Estos intervalos también se han podido determinar para los carpóforos parasitados que sobrepasan el “umbral de ascos” anteriormente definido.

Supone este dato el porcentaje de carpóforos desechables por daños de endoparásitos, directamente en el momento de la recolección.

Por otro lado se compara si las producciones punta de cada temporada son también las más parasitadas o si, por el contrario, la dinámica poblacional del hongo puede distanciarse de la capacidad de reacción de los parásitos asociados. Se agrupan las recolecciones muestreadas en rangos de abundancia según el porcentaje total de producción de la temporada. Cada muestra por tanto tendrá un peso en la producción de la temporada y un grado de infestación registrado. Se lleva a cabo un análisis de Anova Simple que compare las medias de ambas series. Como Variable Dependiente se establece el porcentaje de infestación y como Factor el rango de producción que supuso. Todo ello bajo un nivel de confianza del 95%. Estas mismas variables se someten a un análisis de Múltiples Rangos, dónde se aplica un procedimiento de comparación múltiple que determina qué medias son significativamente diferentes a otras. Además se identifican posibles grupos homogéneos cuyas medias se asemejan con una mínima diferencia. Esto nos dirá si algún rango de producción tiene o no semejanzas con un determinado porcentaje de parasitación. El método a emplear para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) (Fisher, 1935). Con este método habrá un riesgo del 5% al decir que cada par de medias es significativamente diferente cuando la diferencia real es igual a cero.

Todos los análisis de varianza se validan demostrando la normalidad de los residuos resultantes, además se comprueba que son independientes, con medias próximas a cero y variabilidad constante con una Tabla de Variables Canónicas. Se aplica un gráfico de análisis de muestras, ANOM, para comparar las medias de varias muestras y se someten las series a una verificación de la Varianza (Levene, 1960) y prueba de Kruskal Wallis (Kruskal and Wallis, 1952) así como Análisis de Subgrupos para que se comparen las características de estadísticos resumen.

2.3 Ensayo de control de dípteros mediante atrayentes.

Se realiza un ensayo de control con trampas para capturas de la entomofauna existente en la pradera. Se utilizan trampas tipo “mosquero” que basan su funcionamiento en un atrayente. Atrayente se considera a todo producto que se utiliza con la finalidad de modificar el comportamiento de un insecto, conduciéndolo al cebo (Liedo *et al.*, 1989). Las soluciones proteicas significan un fuerte atrayente genérico del Orden Diptera. Fue descubierto por Mcphail en 1939. Investiga que la atracción de los dípteros tefrítidos a los azúcares impuros fermentados se debía a las proteínas en descomposición (Galum, 1968; Iperti, 1983; Prota, 1982 y Russel-Smith, 1979).

Los ensayos con trampas de captura se diseñan durante la temporada otoñal de seta de cardo del año 2007. Se elige para cebar estas trampas una proteína hidrolizada (Smellfol) que es un atrayente de dípteros (De Liñan, C. y De Liñan, V. 2014). En cada finca se observan las capturas diariamente durante siete semanas consecutivas.

Se diseña este estudio con una doble finalidad: por un lado la captura de dípteros en su fase imago es necesaria para identificar taxonómicamente las especies. Además la cuantía de las capturas evalúa las poblaciones de dípteros existentes. Por otro lado, se lleva a cabo un ensayo de control biológico de los parásitos y se observa la posible disminución de los daños provocados en las recolecciones.

Objetivos del estudio:

- Comprobar la presencia y abundancia de dípteros micófagos presentes en las parcelas.
- Observar el poder atrayente del Smellfol para los dípteros en estudio.

En el caso de tratarse de un atrayente eficaz con la especie, comprobar si las capturas realizadas gracias al atrayente se reflejan en una reducción de

puestas y larvas en los carpóforos recolectados, mejorando así la calidad de las recolecciones. Es probable que para reducir las poblaciones de dípteros de forma notoria, se necesiten estudiar atrayentes mucho más específicos, como pueden ser, en caso de que las emitan, feromonas sexuales. Éste estudio busca simplemente un primer acercamiento a la densidad poblacional y sus preferencias nutricionales.

El material y la metodología han sido:

- Caldo de solución atrayente con base acuosa al 9% de proteína hidrolizada Smellfol y 3% de borato de sodio Borax. Smellfol es un concentrado de proteínas hidrolizadas al 30% de la casa Agrofyt, muy similar al Nulure, recomendado como materia base para mezclar con insecticidas autorizados en la preparación de cebos destinados al control de adultos del Orden Diptera (moscas y mosquitos) en cultivos de cerezo y frutales de hoja caduca, cítricos y olivos (De Liñan, C. y De Liñan, V. 2014). El Borax es borato de sodio de la casa Cofares Sociedad Farmacéutica al 99,5% de puerza. Alarga la vida de la proteína hidrolizada actuando como antipútrido (Hernández-Ortiz, 2004). Es insecticida y se utiliza también en medicina por lo que se puede obtener en una farmacia convencional. En principio las características del producto se mantienen idóneas durante los 15 días siguientes a su preparación. De hacer demasiado calor, dicho producto perderá progresivamente su función y su renovación se realiza cada 10 días máximo.

- Dos trampas de captura tipo “mosquero” modelo cilíndrico Macphail Tram de la casa Sorygar de 450 centímetros cúbicos de capacidad. La solución atrayente se vierte en el recipiente amarillo hasta 2/3 de su altura. Se cierra con la carcasa transparente y se colocan sobre la maleza a unos 7cm de altura del suelo, donde se encuentra el ambiente de vuelo de los dípteros asociados a las producciones micológicas en general (Chandler, 1977; Russell-Smith, 1979). Los insectos entrarán por el orificio inferior y se dirigirán a la solución, quedando atrapados en ella.

- Una trampa de captura tipo “mosquero” modelo rectangular Easy Tramp de la casa Sorygar de 400 centímetros cúbicos de capacidad. La capacidad para ésta es tres veces menor. De la misma forma se vierte el caldo atrayente en la mitad amarilla y se tapa con la transparente. Éste modelo tiene dos posiciones, verticalmente, colgándola del asa amarilla que se ve en la foto u horizontalmente sobre el suelo pero, de ser utilizada así, el orificio de la mitad amarilla limita la altura del vertido a centímetro y medio. Este modelo de trampa de captura lo utilizamos horizontalmente tendido sobre la pradera para que el díptero pueda ser capturado tanto del suelo hacia dentro como de la atmósfera circulante hacia adentro, por los orificios superior e inferior de la trampa.

- Colador de 10 centímetros de diámetro para atrapar los insectos capturados y separarlos del caldo.

- Botes herméticos de 50 mililitros de capacidad para guardar las capturas.

- Alcohol 70° para conservación de los insectos dentro del bote anterior. Esto consiste en 700 centímetros cúbicos de etanol absoluto (equivalente a 800 centímetros cúbicos de alcohol de 90° desnaturalizado) y 425 centímetros cúbicos de agua.

Se trabaja solamente con las parcelas de muestreo marcadas dentro de cada finca. Son tres parcelas de $50 \times 25 \text{ m} = 1.250 \text{ m}^2$.

Se realiza una recolección inicial que se etiquetará como Muestra N° 0 y que servirá como muestra de comparación. Inmediatamente después de esta recolección se colocan las trampas de captura en el centro de cada parcela (Fig.17). Cada semana a partir de este momento se recolectan los carpóforos de cada parcela, y se clasifican según su grado de agusanamiento (Ga).

Se analiza si el porcentaje de afectados por parásitos ha disminuido gracias a la captura de dípteros por las trampas o no (numéricamente se comparan los porcentajes con los de la Muestra N° 0 y, además, se realiza un gráfico de la evolución de los porcentajes de parasitación en las parcelas en comparación con la evolución en el resto de la finca de muestreo).

Por otro lado, y también cada semana se recogen todos los insectos de la solución proteica, anotando el número de individuos capturados y, si es posible, su identificación taxonómica más precisa. Se anotan todo tipo de observaciones como la posible congelación o evaporación del caldo, que pudiera restar eficacia a las trampas. Las capturas se conservan en botes con etanol rebajado al 70%.

La solución se renueva cada 15 días a no ser que se vea alterada, haya sufrido congelación, evaporación etc.

Fig.17. Colocación de las trampas en el centro de cada parcela; sobre la maleza ó apoyada en piedras para mantener elevado a unos centímetros del suelo el orificio de entrada (ambiente de vuelo aproximado de los dípteros asociados a las producciones micológicas (Chandler, 1977)).

Los datos obtenidos, se recogen en estadillos en los que se incluye fecha de recolección, parcela, grados de agusanamiento, y comprobación de estos porcentajes con la muestra de comparación (Fig.18).

MUESTREO N° ----

Fecha. N° Parcela. Superficie.

Recolección:

PARCELA sin trampas		MUESTRA N° 0
Grados de agusanamiento		N° carpóforos
Ga1	Carpóforos limpios de galerías (pie y sombrero limpios)	
Ga2	Carpóforos <u>poco</u> agusanados (0- 25% afectado)	
Ga3	Carpóforos <u>algo</u> agusanados (25-50% afectado)	
Ga4	Carpóforos <u>muy</u> agusanados (+ 50% afectado)	

PARCELA con trampas		MUESTRA N° --
Grados de agusanamiento		N° carpóforos
Ga1	Carpóforos limpios de galerías (pie y sombrero limpios)	
Ga2	Carpóforos <u>poco</u> agusanados (0- 25% afectado)	
Ga3	Carpóforos <u>algo</u> agusanados (25-50% afectado)	
Ga4	Carpóforos <u>muy</u> agusanados (+ 50% afectado)	

COMPARACIÓN PORCENTUAL DEL N° CARPÓFOROS AGUSANADOS:

Comparando el % de casos con presencia visual de larvas, con la MUESTRA N° 0 (sin trampas de captura en la parcela):.....%..... y a día de hoy%

RECOGIDA DE LOS INSECTOS DE LA TRAMPA:

<u>Identificación taxonómica</u>	<u>N° individuos</u>

FOTOGRAFÍAS:

OBSERVACIONES:

Fig. 18. Estadillo de toma de datos del Ensayo de control de dípteros por atrayentes.

2.4 Presencia de parásitos en setas comercializadas. Estudio de mercado.

Con el fin de obtener una aproximación directa de la importancia económica de las parasitaciones en las setas silvestres, se desarrolla un muestreo en una tienda especializada en setas silvestres frescas. Se analizan los carpóforos muestreados para ver si existen parásitos internos. De encontrarse ejemplares parasitados se cuantifica el daño de igual manera que se viene realizando para *Pleurotus eryngii* (páginas 66 y 67). Por último se tratan de evolucionar las larvas para la identificación taxonómica del adulto. La presencia de parásitos o no y su abundancia dará idea de en qué medida deprecian estas larvas el producto final. Se comprueba si la evolución del díptero continúa una vez que el carpóforo es recolectado. Por último se pretende dar cuenta de si estos dípteros llegan a nuestra cadena alimenticia y la aptitud del consumidor ante éste hecho.

El estudio se realiza en una tienda de productos *delicatessen* que se encuentra en Madrid (c/ Ortega y Gasset 96). Este comercio es elegido por ser especialista en hongos silvestres comestibles, nacionales y de temporada.

Se compran muestras representativas de carpóforos de diferentes especies sin elegir los ejemplares, es decir, aleatoriamente, recogiendo en estadillos datos cómo presentación, especie, procedencia, precio y aspecto externo inicial. En el laboratorio, se observan los signos externos de desperfectos (perforaciones, cutículas rotas, láminas descolgadas, coloraciones...). Se seccionan y se toman datos de si presentan larvas, el grado de agusanamiento, galerías y otras observaciones de los tejidos internos del carpóforo que denoten parásitos internos. Se preparan las muestras parasitadas para intentar la evolución de las larvas hasta su estado imago y proceder a su identificación taxonómica. Ésta cría de larvas conlleva la misma metodología que la cría de las larvas procedentes de las praderas de estudio de *P.eryngii* y se detalla en el estudio referente, punto 2.6 de este mismo capítulo.

2.4.1. Toma de muestras.

Se elige un método de muestreo probabilístico basado en el principio de equi-probabilidad. Es decir, aquellos en los que todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser elegidos para formar parte de una muestra y, consiguientemente, todas las posibles muestras de igual tamaño tienen la misma probabilidad de ser elegidas (Santos, 1993).

Se realiza un muestreo aleatorio simple por lo que, en cualquier fase de la obtención de la muestra cada individuo que no ha sido seleccionado previamente, tiene la misma probabilidad de ser elegido (Michelt Tripod, 2010). La ventaja de este método de muestreo es que se aplican en poblaciones pequeñas y se puede elaborar el listado de individuos (Santos, 1993).

Se eligen remesas de cinco con una única extracción, diez en dos extracciones de la misma muestra o veinte ejemplares en cuatro extracciones de la misma muestra, todo ello sin repetición. Las especies, a su vez, también se eligen aleatoriamente de entre la oferta presentada. Todas los carpóforos se presentan al público en cajas de 5 kilogramos y cada muestreo está pesado por lo que podemos aproximar el número de individuos de la muestra total.

2.4.2. Análisis estadístico.

La variable aleatoria será saber si el ejemplar esta parasitado o no lo está.

Al tratarse de una variable cualitativa el tamaño de muestra lo determinará la dispersión, a un nivel de significación del 95% y con un coeficiente de confianza del 5%. El error en la estimación será definido por el error relativo. El tamaño poblacional es de universo finito ($N \leq 100.000$). Se ha considerado la variabilidad positiva igual que la variabilidad negativa (Salkind, 1999).

Se realiza un primer muestreo de 80 ejemplares de 8 especies diferentes. Además se utiliza este primer muestreo, con tamaño muestral n_0 , para calcular

el número mínimo de muestras, “n”, que se deben tomar si se quiere analizar la calidad del producto, haciendo el muestreo representativo del total de la oferta de setas del comercio, con un 95 % de confianza y con un error en la estimación no mayor de 0,05.

Siendo el conjunto $A = \{\text{carpóforos parasitados en mayor o menor medida}\}$ y $p = P\{A\}$ = porcentaje de carpóforos parasitados en tienda. Tomando como estimador $\hat{p}$ = prevalencias medias de parasitación que se están observando en campo (resultado proveniente del estudio de prevalencias de parasitación, apartado 2.1 de este capítulo). Se determina el tamaño de muestra mínimo, “n”, que debe realizarse para estimar un porcentaje de carpóforos en el comercio:

$$N \geq n_0 = (Z_{0,975} / d_0)^2 * \hat{p} (1 - \hat{p})$$

$$\text{Si } n_0 / N > 0,05 \rightarrow n \geq n' = n_0 / (1 + n_0 / N)$$

Una vez calculado el número mínimo de muestras que satisfaga una aproximación suficiente del porcentaje de carpóforos parasitados que podemos encontrar en una frutería, se repite el muestreo atendiendo a este número de muestras y procediendo con la misma metodología.

Por último se calculan los principales estadísticos representativos de la probabilidad.

2.5 Respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial.

Al igual que otros organismos vivos, los insectos son capaces de sobrevivir únicamente dentro de ciertos límites marcados por factores ambientales como la temperatura, la humedad relativa o el fotoperiodo. Dentro de este rango, estos factores influyen a su vez sobre el nivel de respuesta de actividades tales como la alimentación, la dispersión, la puesta o el desarrollo (Vargas *et al.*, 1996; Marco, 2001).

De todos los factores ambientales, el que ejerce un efecto mayor sobre el desarrollo de los insectos es, probablemente, la temperatura. Ello es debido principalmente a su importante incidencia sobre los procesos bioquímicos, al ser organismos poiquiloterms. Por tanto, no es de extrañar que la idea de utilizar la temperatura y su influencia sobre el tiempo de desarrollo como instrumento de predicción, haya sido ampliamente utilizada (Wagner *et al.*, 1984). También es cierto que muchos insectos desarrollan tolerancias al frío y/o tácticas que evitan la congelación previa a la diapausa estival. Este último aspecto se ha estudiado, precisamente con un nematócero fungívoro del género *Exechia* (Diptera: Mycetophilidae) (Sformo, 2009).

A lo largo de los años, varios métodos se han basado en la relación tasa de desarrollo-temperatura, con fines predictivos. Se conoce, por ejemplo, que la temperatura influye enormemente en el desarrollo de las cápsulas cefálicas (Arnold, 1960). De todos ellos, el más extendido es el llamado método de grados-día. La modelización de la relación “tasa de desarrollo-temperatura” como base para el cálculo de umbrales mínimos de desarrollo e integrales térmicas.

Siguiendo estos fundamentos, el primer método sencillo de intentar evitar que las larvas alcancen tamaños mayores en el interior de los carpóforos es practicarles frío, pudiendo retrasar su ciclo biológico al ralentizar el metabolismo y que se evite la presencia de larvas el mayor tiempo posible.

Se trata de comprobar si, de los carpóforos de *P.eryngii* que se recolectan parasitados, las larvas que se albergan en su interior varían su evolución o comportamiento a causa del frío artificial. Se comprobará que ocurre con las parasitaciones en las neveras o almacenes de frío industrial que se utilizan para su conservación hasta su venta. El comportamiento de estas larvas se compara posteriormente con las pautas evolutivas que se estudian en la cría de larvas que desarrolla el punto 2.6 de este capítulo.

Se trabaja aquí con carpóforos adultos de *P. eryngii* que presentan larvas de parásitos en sus tejidos internos. No se hace distinción en el grado de agusanamiento que presente el ejemplar sino, únicamente, que esté parasitado.

La cámara frigorífica utilizada es una cámara de conservación industrial homologada para comercios y restaurantes. El fundamento de éste tipo de cámaras es el de refrigerar productos animales y vegetales frescos, sin llegar a su congelación. Marca y modelo Arévalo serie 205. C-28 MT. Rango de temperaturas que alcanza: $T^a_{\min}$: -5°C $T^a_{\max}$: 12°C.

La metodología es la siguiente: La primera bandeja de 5 carpóforos afectados por parasitaciones, pasará 24 horas a temperaturas de -2 °C. Se aumenta la temperatura de la cámara y una segunda bandeja de otros 5 carpóforos afectados pasará 24 horas a la temperatura de 0 °C. Así, sucesivamente, durante 5 días que dura el experimento. Los tiempos de exposición a cada temperatura y las propias temperaturas se han elegido acorde con el tiempo de conservación y el punto de congelación de los carpóforos respectivamente. A menores temperaturas de la cámara frigorífica, los tejidos comenzarían su congelación y la flexibilidad y textura se deteriora tras su descongelación, depreciando el producto. Temperaturas por encima de los 8 °C deprecian los tejidos y no serviría de conservación del producto.

Los posibles cambios o no cambios que se presenten en la evolución de las larvas ó de los carpóforos, así cómo observaciones de cambios de conducta, parada de crecimiento, muerte, salida al exterior del carpóforo, etc. queda recogido en estadillos como el que se muestra en la figura siguiente (Fig.19).

Estadio evolutivo aproximado de las larvas:	T ^a	Tiempo de exposición	Efectos en la larva	Efectos en los carpóforos
	-2 °C	24h		
	0 °C	24h		
	+2 °C	24h		
	+4 °C	24h		
	+8 °C	24h		

Fig. 19. Estadillo de toma de datos en el estudio de la respuesta de larvas al frío artificial.

Los siguientes estudios que se exponen tiene el objetivo de conocer la biología de las especies parásitas encontradas, determinar su etología, ciclo biológico y potencial biótico.

Para ello se diseñan muestreos en campo que deben atender al grado evolutivo del carpóforo. Por ejemplo, la cría de larvas que se va a exponer exige trabajar con muestras adultas y, en el estudio del momento de la puesta que se detallará más adelante, se necesitaron hongos recién fructificados.

Por tanto, en la evolución natural de *P.eryngii* en campo se han diferenciado cinco estadios evolutivos a los cuáles se hará referencia a partir de ahora (Hiukko, 1978; Hackman y Meinander, 1979; Bruns, 1984). La figura nº 20 representa un esquema de la clasificación utilizada en el manejo de las muestras.

L₀: El micelio activo bajo tierra. Si limpiamos la hierba y la hojarasca de la superficie, dejando al descubierto la tierra limpia, no se aprecia el pié.

L₁: Ejemplar no pigmentado y sombrero no formado. Limpiando la superficie de hierbas y hojarasca, se descubre un sombrero emergente con el sombrero aún blanco y poco formado.

L₂: Ejemplar pigmentado y sombrero poco formado. Alas del sombrero no desplegadas.

L₃: Ejemplar pigmentado y sombrero formado

L₄: Ejemplar con descomposición natural avanzada. Se ha producido la diseminación de las esporas y la seta presenta síntomas de pérdida de humedad.

Fig.20. Clasificación establecida para la toma de muestras en los trabajos de campo y que atiende a los diferentes estadios evolutivos de la fructificación del hongo *P.eryngii* en campo.

Para la extracción de muestras únicamente se consideran los ejemplares que claramente pertenecen a una u otra clasificación, no considerando los carpóforos que generan una dudosa clasificación (Fig. 21). Las muestras extraídas son tratadas en el laboratorio de acuerdo con el estudio al que se destinan.

Fig.21. *P.eryngii* fructificado con carpóforos en diferentes estadios evolutivos, L_1 y L_2 .

Además de la extracción de muestras que se llevan a laboratorio, una parte del trabajo se desarrolla en el propio campo, observando la evolución de las parasitaciones en su hábitat natural.

2.6 Cría de larvas para la obtención de adultos en laboratorio.

Se pretende determinar las especies endoparásitas de *Pleurotus eryngii* y para ello, la identificación taxonómica de estas especies, como la de todos los insectos Endopterygota, se facilita con la obtención de insectos adultos.

Por ello se crían las larvas encontradas en el interior de los carpóforos de este hongo. Ésta forma de captura asegura la obtención solo de la entomofauna parásita que utiliza el cuerpo del carpóforo para la evolución de sus puestas, y excluye insectos criados en otras especies de hongos e incluso en otros lugares cercanos como el humus, la hojarasca, otros frutos, arrastrados por el viento etc.

Se reproduce en laboratorio el proceso evolutivo comprendido desde que el carpóforo en estadio adulto o L₃ presenta larvas visibles hasta la emergencia de los adultos de las pupas (Fig.22).

Fig.22. Interior de un evolucionario con el carpóforo parasitado. Permanecerá aislada durante todo el proceso de la cría.

Con la obtención de insectos adultos en ambiente controlado se pretende tener un seguimiento exhaustivo de su proceso evolutivo. Se desarrolla así una base de datos con los tiempos que necesita la larva para desarrollarse dentro

del cuerpo del carpóforo, lugar y tiempo necesario de pupación, porcentaje de adultos exitosos por puesta, preferencias al elegir el lugar de pupación y su proceso.

2.6.1 Toma de muestras.

En este estudio no se trabaja con carpóforos en estadio L₂ por ser un estadio evolutivo en el que las larvas, de existir, no se aprecian a simple vista. Tampoco se trabaja con el estadio L₄ por ser un estadio evolutivo demasiado maduro para las observaciones requeridas. Por tanto, las muestras son siempre en estadio evolutivo L₃ y parasitadas de forma natural.

Para ello, en las fincas de muestreo, se secciona transversalmente el pie con ayuda de un bisturí, procurando no comprimirlo; la sección se practica en la parte más baja del pie, conectando ya con el micelio. Si con ésta incisión no se detecta la presencia de larvas, se practica una nueva incisión axial en el centro del pie, se observa el interior y se comprueba si está parasitada.

Esta metodología permite controlar en laboratorio todo lo que ocurre con carpóforos contaminados desde L₃ en adelante (Fig.23).

La literatura referente a la cría de los nematódicos fungívoros asociados con hongos macrofúngicos asocia hábitos de pupación subterráneos (Edwards, 1925; Thompson, 1930); otros autores asocian la pupación de estos insectos a la humedad y oscuridad de las cuevas (Peck, 1988; Kjærandsen, 1993). Por ello se decide reproducir el hábitat natural incluyendo la vegetación inmediatamente próxima, la raíz del cardo micorrizado, el sustrato y el micelio de hongo.

Fig.23. Estadio evolutivo del carpóforo parasitado en la que se aísla y controla la evolución de sus larvas. A partir de este momento se toman datos referentes a los días que las larvas permanecen alimentándose en el interior, el tiempo que tardan en pupar y lugar de pupación, su metamorfosis y los días que vive el/los insecto parásito adulto.

Todas las muestras con larvas en su interior se mantienen en recipientes individuales de plástico PVC transparente de 10x10x10 cm y con tapa de malla de 50 micras de luz. El carpóforo muestreado se coloca sobre sustrato obtenido de las praderas sin inversión de horizontes edáficos (Fig.24). Los tejidos del hospedante servirá de alimento a las larvas hasta su total desarrollo y el sustrato será el hábitat de las pupas. Se reproduce el grado de humedad natural con pulverizaciones de agua periódicas (Modi, 1983; Šedivý, 2003).

Fig.24. Evolucionario para muestras individuales. Recipiente de plástico con apertura transpirable de red de 50 μ m.

Las condiciones ambientales controladas en laboratorio son las siguientes: Temperatura para el crecimiento del micelio 24°C, temperatura para la fructificación 14°C, humedad para la fructificación 80%, humedad edáfica de fructificación cercana a la capacidad de campo del terreno (Calvo-Bado, 2001; Jiménez, 2009).

Diariamente se observa la evolución de los carpóforos y se anotan los siguientes datos: fecha de inicio, que corresponde con la fecha de muestreo; momento de salida de las larvas del carpóforo hacia el sustrato para pupar; si esta salida se produce en conjunto de todas las larvas o en varias salidas; tamaño aproximado de las larvas que salen a pupar, comparándolo con tamaños máximos observados en campo; lugar del carpóforo por el que salen las lavas; tiempo que tardan en construir el pupario; fecha en que todas se encuentran pupando; número de larvas o puparios fracasados y día de emergencia de los adultos. Los adultos emergidos se identifican taxonómicamente clasificándose por sexos y especies.

Se han realizado 23 repeticiones del estudio con un total de, al menos, 209 larvas iniciales.

2.6.2 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se han desarrollado en el entorno SPSS 15.0.1 software (SPPSS Inc, 2006) con el criterio estándar de probabilidad ($p < 0,05$) y considerando que la unidad muestral es cada una de las repeticiones del ensayo de cría de larvas.

Se obtienen series de datos tanto cualitativos cómo cuantitativos de los que se analizan directamente sus estadísticos principales en unos casos o se trasforman y elaboran en nuevas series para poder analizarse en otros. Las observaciones que proporcionan series de datos susceptibles de un análisis directo son: tamaño aproximado de las larvas que han salido a pupar, el lugar del carpóforo elegido para dirigirse al sustrato, el número de larvas fracasadas,

el lugar de pupación, el tiempo ocupado en construir el pupario y el número de puparios fracasados. A través de las fechas en que las larvas terminan de construir el pupario y las fechas de emergencia de los imagos obtenemos otra serie de datos más, el número de días de pupación.

Un total de 198 larvas se han podido observar saliendo del carpóforo para pupar. También se han podido observar en alguna de las muestras larvas y pupas fracasadas. Éstas observaciones, junto con el número de imagos resultantes hace que podamos determinar la mortalidad en larva y la mortalidad en pupa que tiene el estudio. Los casos en los que las muestras resultaron estar parasitadas por varias especies no se han tenido en cuenta en el análisis de mortalidades por especies, sí para el análisis de mortalidades totales del estudio.

Para todas estas series de datos se presentan sus principales estadísticos: se comprueba si los datos pueden asemejarse a una Distribución Normal sometiéndolos al análisis de una variable y posteriormente realizando una comprobación visual, un gráfico de normalidad, y dos análisis numéricos de Sesgo Estandarizado y Curtosis Estandarizada (Lawrence, 1997).

Se eliminan los puntos extremos detectados siempre que se trate de causas asumibles o explicables debidamente justificadas. Ningún punto extremo fue detectado y descartado del análisis.

Finalmente se indican intervalos de confianza para la media y, en el caso que lo permita, para la desviación estándar de estos datos.

Adelantando un resultado principal: se ha registrado una especie principal que parasita preferentemente y, de menor entidad pero presente, una segunda especie parásita. El hecho de que resulten ciertas muestras parasitadas por varias especies exige estudios de análisis comparativo.

Larvas de diferentes especies con un hospedante en común pueden entrar en competencia por lo que se considera necesario realizar un análisis comparativo de las mortalidades registradas en el estudio, tanto en estadio larvario como pupario. Es necesario definir las relaciones e influencias entre ambos parásitos así como sus posibles similitudes o diferencias en sus ciclos biológicos. No obstante, como se posee un volumen de muestras que han resultado únicamente parasitadas por la especie dominante, pueden utilizarse para definir ciertos aspectos de su ciclo biológico en exclusiva, desestimando las muestras contaminadas por otras especies o en conjunto con esta.

Los resultados de mortalidad en larvas y en pupas se han analizado estadísticamente para el total del estudio y, paralelamente, se analizan los resultados de las repeticiones en las que resultaron estar parasitados únicamente por el parásito predominante, incluyéndose en este segundo análisis solo las repeticiones en que las crías de larvas concluyeron únicamente imagos de esta especie. Se trata de comparar los datos estadísticos de ambas hojas para concluir la inferencia estadística de la hoja de datos exclusiva del parásito de mayor interés.

Después de comprobar que las series pueden asemejarse a la distribución normal (además de los análisis antes mencionados se realizan las pruebas de ajustes de datos no censurados y bondad de ajuste de Kolmogorov- Smirnof) se realiza un análisis de Correlaciones: se estudia la Correlación momento producto de Pearson, la Correlación por el rango de Spearman, y Correlaciones Parciales. Por último se realiza un Análisis de Covarianza que demuestre un tanto significativo de variación conjunta.

Realizamos una inferencia estadística para ver si los datos muestrales se asemejan a la población real. Para ello se lleva a cabo un análisis de muestras pareadas (variables: % bajas en pupa y % bajas en pupa muestras parasitadas únicamente por la especie prevalente y el mismo análisis para las bajas en larva). Este procedimiento está diseñado para evaluar diferencias significativas entre dos muestras de datos que fueron colectados agrupados

como parejas. Se calcularán varias estadísticas y gráficas para la diferencia de los datos pareados. También están incluidas en el procedimiento las pruebas diseñadas para determinar si la diferencia media es igual a cero.

A través de un Análisis de Correlaciones Canónicas se compara cual de las dos especies parásitas resultantes presenta más mortalidad en sus fases inmaduras. Para ello se han realizado dos conjuntos: el primero engloba las series de datos de la mortalidad en larva y la mortalidad en pupa totales para el estudio y, el segundo conjunto, engloba las serie de datos de prevalencia de parasitación de una especie y las series de datos de la prevalencia de la otra especie. Este procedimiento encuentra las combinaciones lineales de los dos conjuntos de variables que tienen la mayor correlación entre ellas.

Aplicando el Análisis de Varianza (ANOVA suma de cuadrados Tipo III) se estudia si existe relación estadísticamente significativa entre las bajas observadas y el tamaño que alcanzaron en el momento de la pupación. Ambas variables con un nivel de confianza del 95,0%.

La cría de insectos artificial puede ser alterada en uno o muchos de sus factores. Se ha intentado reproducir el hábitat lo más posible. No obstante, todos los aspectos del proceso que se han observado durante el estudio se han sometido a un análisis de Componentes Principales. El propósito es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. Las series de datos que se toman como variables han sido: porcentaje total de bajas en larvas, porcentaje total de bajas en pupa, tamaño larval alcanzado en el momento de la pupación, horas en realizar la pupa, días pupando, imagos de la especie predominante resultantes e imagos de la especie menos predominante resultantes. (Quinn y Keough, 2002).

Un último dato a estudiar y que se deduce de las identificaciones taxonómicas de los adultos resultantes es el sex *ratio* de las especies parásitas

implicadas. Es importante analizar el valor del estadístico moda pues, un valor nulo indicaría que la mayoría de las puestas de los parásitos son unisexuadas.

Las prevalencias de parasitación por especies que se deducen de este estudio se hacen extensibles a los resultados de prevalencias de parasitación del estudio referente (punto 2.1 de este capítulo). Por tanto se puede aproximar una prevalencia de parasitación para cada especie endoparásita en el total de la zona de estudio.

2.7 Estudio del momento de la puesta.

El poder de adaptación de los insectos es, entre los seres vivos, el más grande y variado, encontrándoseles en gran diversidad de nichos biológicos. El estudio de los insectos en sus condiciones naturales reviste indudablemente importancia primaria para fines de control; sin embargo, requieren un elemento de apoyo que permita observaciones más particulares para la determinación de especies o para análisis gobernado de ciertos factores, de influencia aislada o combinada sobre los insectos, que interesa conocer para precisar aspectos de comportamiento, variación, etc. (Perusquía, 2012).

El estudio de la puesta del parásito consiste en realizar un seguimiento del desarrollo del hongo, partiendo desde diferentes estadios evolutivos de sus carpóforos. En un momento dado, el hongo fructificado se aísla con red de malla impidiendo nuevas parasitaciones y se observa su evolución. Al final del seguimiento, llegada la descomposición natural del carpóforo o estadio L_4 , se comprueba si son ejemplares contaminados. De ser así, la parasitación se produjo con anterioridad al aislamiento.

A diferencia del estudio anterior, ahora se trabaja con todos los estadios evolutivos de los carpóforos (L_0 , L_1 , L_2 , L_3 y L_4) y con el hongo completo (micelio y cuerpo de fructificación).

Se trata de estudiar el momento evolutivo en el que se encuentran los carpóforos de *Pleurotus eryngii* cuándo los parásitos realizan sus puestas en él.

La metodología es la siguiente:

Se extraen de las tres fincas de muestreo, de forma aleatoria, muestras compuestas por cepellón con profundidad de 15 cm, raíz del cardo asociado, micelio y cuerpos de fructificación en diferentes estadios evolutivos.

Aislándolos individualmente en evolucionarios, se mantienen, con riegos pulverizados, a lo largo de un mes, ó hasta su pudrición (Modi, 1983; Šedivý, 2003).

Se toman notas y observaciones de todos los aspectos que se puedan percibir externamente: si el hongo ha parado su evolución, si el carpóforo pierde frescura, presencia de perforaciones en sombrero ó pie etc., adjuntando las observaciones más notorias de fotografías o esquemas y recopilando los datos en estadillos con formato de tablas y, de forma individual para el seguimiento de cada muestra.

Semanalmente se añaden 4 nuevas muestras y las anotaciones se realizan dos veces por semana. Se han realizado 27 aislamientos, 20 en laboratorio y 7 en campo.

El aislamiento se consigue de dos formas:

- En laboratorio, con recipientes de plástico PVC transparente de 10x10x10 cm y con tapa de malla de 50 micras de luz (Fig.23 dcha.).
- In situ en el campo, con botellas de plástico cortadas y cerrando el corte con una red de 50 micras de luz. Se entierran en el suelo unos 5cm y dejan el micelio en el interior. Necesitan de riegos porque la botella actúa de invernadero desecándolas (Fig.25 izq.).

Fig.25. Ejemplo de un aislamiento del hongo en campo y otro en laboratorio. En el caso de la fotografía de la izquierda se aísla una muestra en estado de desarrollo inmaduro o L_2 y en la fotografía de la derecha se aísla una muestra en estado de desarrollo avanzado o L_3 .

2.8 Cuarentenas de carpóforos aparentemente no parasitados.

La cuarentena de carpóforos se realiza en ejemplares maduros catalogados como “no parasitados” después del análisis visual de sus tejidos. Estas cuarentenas verificarán o no esta primera clasificación visual. El estudio mostrará la evolución de las puestas de parásitos en comparación con la evolución de su cuerpo huésped.

Se toman muestreos de 15 ejemplares en estadio L_3 . Seccionándolas longitudinalmente en 4 sectores, se observa, bajo lupa binocular, el tejido interior del carpóforo para asegurarse de la no presencia de larvas, galerías o cualquier indicio de posibles parasitaciones. Observar únicamente el aspecto exterior o la sección del pie que se realiza para su extracción no sería suficiente.

Se introducen los sectores resultantes de cada muestra en bolsas de rafia. La rafia permite la transpiración del hongo pero impide una posible nueva parasitación.

Se conservan durante una semana en el laboratorio, en las condiciones ambientales citadas para el estudio de la cría de larvas, apartado 2.6.

Tras éste periodo, de abre la bolsa de tela y se observa, primero exteriormente y después, rompiendo los sectores, interiormente. Se anota cualquier daño, coloración, pérdida de frescura, galerías, presencia de larvas... que inicialmente no se detectaron. Caso de descubrir nuevas larvas en algún sector se toman datos cómo: zona de encuentro, número de ejemplares, tamaño, estado del tejido interno del sector, si han salido de él, qué cutícula han perforado para salir, etc.... y se trata de que evolucionen hasta adultos.

Se han sometido a estas cuarentenas 290 ejemplares.

Los datos se recopilan en el mismo estadillo que para los estudios del control de recolecciones (Fig.16).

2.8.1 Análisis estadístico.

Las series de datos obtenidas son el número de ejemplares que se someten a cuarentenas y el número de ellos que resultaron estar parasitados.

Se comprueba si los datos provienen de una distribución normal: se someten al análisis de una variable y se desarrolla un gráfico de probabilidad normal. Se comprueba también cuantitativamente con los análisis de Sesgo Estandarizado y Curtosis Estandarizada (Lawrence, 1997).

Finalmente se indican intervalos de confianza para la media de carpóforos que, tras parecer no parasitados, acabaran desarrollando larvas, no siendo significativo mostrar los intervalos de la desviación estándar, en este caso.

El análisis estadísticos se desarrolla en el entorno SPSS 15.0.1 software (SPSS Inc, 2006) con el criterio estándar de probabilidad ($p < 0,05$) y considerando que la unidad muestral es cada una de las fincas de estudio.

2.9 Observaciones al microscopio de carpóforos parasitados.

Se estudian microscópicamente ejemplares parasitados, tomando datos y material fotográfico sobre las dimensiones de las diferentes galerías encontradas y zonas de muda. Con éstas observaciones identificamos los tropismos llevados a cabo por las larvas en el interior del carpóforo: las galerías de menor dimensión y su lugar de ubicación indica los lugares dónde las larvas han habitado en sus primeros estadios y posibles zonas de colocación de las puestas; las mayores galerías reflejan los hábitos y preferencias de las larvas en sus últimos estados. También el número y lugar de las cavidades utilizadas para mudar y los restos de muda como cápsulas cefálicas encontrados en el interior pueden determinar hábitos de las larvas (Chandler, 1969; Makeenko, 1986).

Se lleva a cabo un análisis biométrico de todas las cápsulas cefálicas encontradas en un mismo carpóforo, a sumar con las pupas fallidas y los imagos resultantes. El recuento define los estadios larvarios a través del número de mudas (Lewis, 1970; Latheef, 1972; Craig, 1974; Ross, 1978; Villanueva-Sánchez, 2013).

Si existían larvas de diferentes especies se relacionan las posibles diferencias o anomalías encontradas. No se tendrán en cuenta esas muestras para la determinación de estadios larvarios por especies.

El material utilizado aquí fue un microscopio óptico marca Zeiss y aumentos 25X, 50X y 100X , lupa binocular de marca Nikon 44105 y aumentos 10X, 12X, 25X, 50X, una cámara fotográfica digital marca Olivetti con 1.5 Megapíxeles acoplada al objetivo. Para las mediciones a la lupa se acopló un medidor digital y, para las mediciones al microscopio, se utilizó un ocular 6X escalado milimétricamente. Éste mismo material fue el utilizado para los apartados siguientes: 2.10 Identificación taxonómica de los parásitos resultantes y 2.11 Descripción de los últimos estadios larvarios de los parásitos resultantes.

Para este estudio se analizan 25 muestras.

2.10 Identificación taxonómica de los parásitos resultantes.

La identificación taxonómica de las especies a través de sus larvas no ha sido posible por la dificultad en encontrar documentación o claves taxonómicas suficientes. Ha sido posible únicamente la identificación hasta nivel de familia (Madwar, 1937; Keilin, 1944).

Se ha realizado la identificación taxonómica de los imagos obtenidos tras las crías y de los ejemplares capturados en las trampas de captura.

Para llegar a identificar los parásitos hasta el nivel de especie exige el preparado de muestras de alas y genitalias como características morfológicas claves.

Las técnicas de preparación microscópica utilizadas para las alas consisten en seccionarlas por su inserción con el tórax, lavarlas en alcohol 76°, someterlas a una tinción por baño de aceite de clavo durante 5 horas y, tras aclararlas en Xilol, se montan en Bálsamo de Canadá ligeramente disuelto con el Xilol.

Para la preparación de las genitalias el seccionado y extracción debe ser más preciso liberándolo del último segmento abdominal. La técnica utilizada aquí primeramente pasa por una estancia de 24 horas en hidróxido de Potasio disuelto en Etanol al 10%. Posteriormente se procede a su aclarado en alcohol 76° y, como técnica de tinción, requiere 24 horas en el baño de esencia de clavo. El aclarado del bálsamo y el montaje se realiza de forma similar a la sección alar. Hasta llegar a el método de preparaciones microscópicas redactado se ha consultado la siguiente bibliografía: García de Viedma, 1964; Majer, 1990; Yélamos, 1990; Vázquez, 1993 y Magro, 2002.

La principal bibliografía utilizada para la identificación taxonómica a nivel de especie corresponde a la relación que se expone a continuación. En primer lugar se citan las obras que contienen claves de géneros de la Familia Mycetophilidae, posteriormente se citan las publicaciones que han servido para identificar las principales especies implicadas:

- Rindal *et al.*, 2009.
- Richards y Davies, 1983.
- Dallai *et al.*, 1995.
- Phillips, 1970.
- Sølvi, 1997.
- Rindal *et al.*, 2007.
- Rindal y Sølvi, 2006.
- Kjaerandsen y Jordal, 2007
- Brill, 1989
- Kjaerandsen, 2005, 2006, 2011.
- Zaitzev, 1993 y 2003.
- Sevcik, 2001.
- Chandler, 1994.
- Ribeiro, 1990.
- Tuomikoski, 1996.

Las principales especies resultantes han sido confirmadas por el Dr. Chandler (Royal Entomological Society of London), experto en la familia Mycetophilidae, que integra todos los parásitos resultantes.

2.11 Descripción de los últimos estadios larvarios de los parásitos resultantes.

Los rasgos morfológicos de las larvas de mycetofílidos se han considerado de gran interés, siendo, por algunos autores, igual de importantes que los rasgos de los imagos. En contraposición, existen pocos estudios referentes, descripciones someras, confusión y falta de homogenización en medidas y términos a describir (Lastovka, 1971).

Debido a la falta de referencias taxonómicas, la identificación de las larvas en los primeros momentos del estudio no ha sido imposible por lo que se ha

tenido que esperar a su fase adulta, identificar dichos imagos y recuperar las muestras de sus larvas, previamente capturadas, para proceder a describirlas.

Para ello se ha realizado la cría de larvas en 8 carpóforos contaminados y se ha procedido al siguiente muestreo: cada día se extraen 2 larvas del interior de los tejidos, hasta el final del proceso. Se conservan en alcohol de 70° identificando el día de la captura y la muestra a la que pertenecen. Cuando la cría ha terminado, se procede a la identificación taxonómica de los adultos. Si la muestra ha resultado estar parasitada por una única especie son aptas para las observaciones de los diferentes estadios larvario, de lo contrario no se considerarán. La metodología a seguir en la cría ha sido la descrita en el apartado 2.6 de este capítulo.

Las preparaciones al microscopio consisten en el seccionado ventral de la larva, la extracción de la cápsula cefálica y la inmersión del material en Hidróxido de Potasio al 10% durante 72 horas. Tras esto, el cuerpo de la larva se estira y se colocan los espiráculos en su posición frontal, tendida sobre una lámina de glicerina vegetal al 85% de la casa Boter y fijándolos, por último, con líquido Hoyer (goma arábica de la casa Ampex Chemical, hidrato de Cloral al 5% de la casa Biomed y agua destilada al 50-25-25% respectivamente). El despiece de las cápsulas cefálicas también se fija con el mismo líquido, guardando 24 horas de secado. Se realizaron varias pruebas hasta llegar a éste método de preparaciones al microscopio y, la bibliografía consultada, fue: García de Viedna, 1964; Majer, 1990; Yélamos, 1990; Vázquez, 1993 y Magro, 2002.

Las mediciones que se han realizado han sido de longitud total de cuerpo, longitud y ancho de cápsula cefálica y el diámetro mayor de espiráculos protorácicos y espiráculos abdominales. Se han realizado con ocular escalado en milímetros de 10X acoplado a lupa binocular y medidor digital y ocular escalado también en milímetros en aumentos 6X acoplado a microscopio óptico. Estas mediciones así como las descripciones realizadas atienden a la literatura encontrada a estos efectos, intentando homogeneizar la poca

documentación que existe al respecto, asumiendo la probabilidad de que estas especies no estén previamente descritas.

Las principales referencias utilizadas han sido:

- Madwar, 1937.
- Krivosheina, 2010.
- Lastouka, 1971.
- Smith, 1989.
- Keilin, 1944.
- Plassmann, 1972.

No se han encontrado referencias sobre la taxonomía larval de las especies resultantes a nivel de especie. A nivel de género se han encontrado dos referencias: Madwar, 1937 y Krivosheina, 2010, siendo ésta última un trabajo de compilación de características ya descritas. El resto de la documentación encontrada se trata de taxonomía larval de la familia Mycetophilidae o de otros géneros más o menos próximos.

Se ha utilizado el mismo material que para las identificaciones taxonómicas de los adultos, anteriormente descrito.

2.12 Análisis de aromas por micro extracción en fase sólida- SPME

El último estudio llevado a cabo se basa en un posible control de los parásitos en su hábitat natural. La búsqueda de un atrayente específico adecuado para llevar a cabo un control biológico puede basarse en el estímulo que lleva a los dípteros a elegir los carpóforos que serán adecuadas para la cría. En los elegidos colocarán sus puestas.

En este trabajo se determina que el momento de la puesta se acerca más a los primeros estadios evolutivos de los carpóforos de *Pleurotus eryngii*¹⁴. Si la puesta no se produce durante este corto periodo de tiempo (unas pocas horas), ya no será posible la parasitación, llegando a la madurez sin presencia de larvas.

Esto anima a estudiar el hecho de que el carpóforo inmaduro produzca un atrayente específico que pueda ser detectado por el insecto. Pese a existir en el ambiente varias especies de parásitos polífagos o adecuados para una especie de hongo hospedante, no todos los hongos se encuentran fenológicamente aptos para ser parasitados (Hanski, 1989).

Por tanto, el análisis de aromas se ha realizado en carpóforos en estadio L₂, comparándolo siempre con el análisis de muestras en el estadio biológicamente más parecido; es decir, el estadio L₃ (Fig.20).

Otro resultado de este trabajo es que la colocación de la puesta tiene lugar en un punto exacto¹⁵: siempre en el tercio superior del pie del carpóforo. Sin embargo, pese al conocimiento del lugar concreto de colocación de las puestas, el estudio del atrayente producido por la misma debe englobar la totalidad de los tejidos, no pudiendo excluirse a priori ninguna región de la misma.

Con respecto a la sustancia atrayente que buscamos, se debe tratar de un compuesto o compuestos volátiles que se perciban en la distancia. Se trata por tanto de compuestos orgánicos capaces de evaporarse con facilidad a temperatura ambiente.

Los compuestos orgánicos de interés podrían actuar como semioquímicos, pues se trata de sustancias que intervienen en la comunicación química entre organismos, asumiendo que el compuesto es emitido con un

¹⁴ Se pueden consultar los resultados del estudio del momento de la puesta en el apartado 3.8 del capítulo 3.

¹⁵ Los resultados de las Observaciones al microscopio muestran que las galerías más estrechas realizadas por las larvas se colocan en el tercio superior del pie. Además se comprobaron orificios en las cutículas exteriores de este lugar. Todo ello se puede consultar en el apartado 3.10 del capítulo 3.

propósito definido hacia el receptor en forma de señal, con lo que se generaría una comunicación. Sin embargo, en la comunicación química el propósito de la emisión del compuesto no existe como tal, aunque el receptor sí utiliza la información que le llega mediante el compuesto.

Las sustancias semioquímicas que intervienen en interacciones dentro de una misma especie reciben el nombre de feromonas. Las sustancias semioquímicas cuya emisión es significativa para un organismo de una especie diferente a la emisora se denominan aleloquímicos.

La clasificación de Nordlung y Lewis (1976) agrupa a las sustancias aleloquímicos en cuatro categorías: alomonas, kairomonas, sinomonas y apneumonas. En la actualidad, el término apneumonas queda integrado en las otras categorías, utilizándose las tres primeras categorías únicamente.

Las alomonas son sustancias producidas o adquiridas por un organismo, que en un contexto natural, y en contacto con un individuo de otra especie producen en el receptor una reacción de comportamiento o fisiológica favorable al emisor. Las kairomonas son compuestos que, en contacto con individuos de otra especie, producen en el receptor una respuesta favorable a este último. Las sinomonas producen en el receptor una respuesta adaptativa favorable, tanto para el emisor como para el receptor (Mareggiani, 2001).

Las sustancias aleloquímicas emitidas por la planta que tienen mayor importancia en la selección del alimento por parte de una plaga son las kairomonas y las alomonas (Blum, 1981; Mareggiani, 1996). La emisión de kairomonas por la planta favorece al insecto porque lo orienta hacia ella, o induce su alimentación u ovoposición, entre otros beneficios. Cuando el aleloquímico emitido es una alomona, resulta favorecida la planta pues disminuye la posibilidad de que un herbívoro generalista o polífago pueda utilizar esa planta como fuente de alimento, ya que lo repele, disuade la alimentación o la ovoposición, e interrumpe su desarrollo, entre otros efectos, por el cual las alomonas actúan como defensas químicas naturales contra los

herbívoros (Dethier *et al.*, 1960; Beck, 1965; Bernays, 2000). Todas estas explicaciones acotan la naturaleza del compuesto que se quiere identificar.

Para el análisis del atrayente, es necesario llevar a cabo la extracción, separación y detección de los compuestos orgánicos de interés. En el caso de los compuestos orgánicos volátiles, el método analítico más utilizado es la cromatografía de gases (CG) (Colonge *et al.*, 2002).

Para la detección de los compuestos la espectrometría de masas (MS) es la técnica más utilizada ya que permite detectar los compuestos e identificarlos en base a su espectro de masas (Duran, 2009).

Puesto que los compuestos volátiles que queremos detectar tienen una concentración previsiblemente baja en el ambiente, que imposibilita una medida instrumental directa, es necesario realizar una extracción y preconcentración de las muestras como etapa previa al análisis cromatográfico de los compuestos. Entre las posibles técnicas extractivas a utilizar para la extracción de los compuestos orgánicos de el carpóforo se encuentran la extracción sólido-líquido, la extracción con Soxhler, la extracción con líquidos presurizados (PLE), la extracción asistida por microondas (MAE) dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Durán, 2013).

En base a las características de los compuestos a analizar se plantea la utilización de la microextracción en fase sólida (SPME) en espacio de cabeza para la extracción de estos compuestos. La SPME es una técnica muy útil en el análisis de compuestos orgánicos volátiles, ya que permite la extracción, concentración de la muestra e inyección directa de la misma en el cromatógrafo para su análisis. Se han realizado una búsqueda bibliográfica para evaluar el estado de la cuestión en el campo de la SPME aplicado a la detección de volátiles y atrayentes asociados a los insectos y claramente se concluye que es el método más utilizado para la preconcentración de la muestra y extracción de los compuestos. Las principales ventajas de la SPME son las siguientes: es

muy simple, tiene un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y, como se indicó anteriormente, no precisa el uso de disolventes orgánicos en la preparación de la muestra. Además, presenta diseños aptos para el transporte y el muestreo en campo. Esta técnica puede ser utilizada para el análisis de muestras gaseosas, líquidos e incluso sólidos. Con solo tres tipos de materiales adsorbentes se cubre una gran variedad de analitos a determinar. Es apropiada, por tanto, al análisis de compuestos volátiles de carpóforos de *P. eryngii* como potenciales atrayentes de los parásitos. Uno de los principales inconvenientes de la SPME es que la distinta afinidad de la fibra según compuestos y la limitada capacidad de estas fibras, en las que el recubrimiento es muy pequeño, pueden resultar en que no se obtenga algún límite de detección bajo (Pérez *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Durán, 2013).

La SPME fue desarrollada a principios de los años 90 por el grupo del Dr. Pawliszyn y debido a su simplicidad y rendimiento ha seguido evolucionando y perfeccionando, y hoy es una técnica que se aplica al análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en matrices muy diversas. Existen dos metodologías de análisis dentro de la SPME:

1º- SPME CON FIBRAS: El proceso de SPME consta de dos etapas principales. La primera etapa es la extracción con una fibra recubierta del sorbente donde se recogen los compuestos de la muestra por absorción en el caso de revestimientos líquidos o adsorción en el caso de revestimientos sólidos tras exponer la fibra a la muestra durante un tiempo determinado a una temperatura controlada. Los analitos migran de la muestra a la fibra hasta que se alcanza un equilibrio. La extracción en SPME con fibra puede llevarse a cabo por inmersión o en el espacio de cabeza. Cuando la extracción se va a realizar por inmersión esta puede tener lugar por inmersión directa o con protección de membranas. En este último modo de extracción se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra que evita que compuestos de elevado peso molecular presentes en la matriz de la muestra dañen la fibra. El modo de extracción en espacio de cabeza tiene como principal ventaja que la

fibra no entra en contacto con la matriz con lo que las posibilidades de ser dañadas disminuyen y resulta más selectiva para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas o biológicas en las que la interferencia de la matriz es importante. En ambos casos, la SPME puede acoplarse a cromatografía de líquidos (CL) o a CG para la separación y análisis de los distintos compuestos extraídos (Durán, 2013).

La segunda etapa consiste en la desorción de los analitos retenidos en la fibra. Esta etapa depende de la técnica analítica que se vaya a utilizar a continuación. Si se emplea la CL para llevar a cabo el análisis, la desorción se realiza empleando algún disolvente orgánico, mientras que en CG la desorción es térmica (Durán, 2013).

La termodinámica predice los efectos producidos por determinadas condiciones de extracción en la distribución de los analitos entre la fibra y la matriz. Estos parámetros son los siguientes: el recubrimiento polimérico de la fibra, la temperatura y el tiempo de extracción, el efecto salino, el pH de la muestra, el volumen de la muestra, el volumen del espacio de cabeza, la agitación de la muestra, y la forma del vial. La naturaleza química del analito determina qué tipo de fase debe ser utilizada en la extracción.

2º- SPME EN TUBO: La extracción de los analitos se lleva a cabo en la superficie interna de una columna capilar recubierta con la fase estacionaria. En este caso, las muestras deben filtrarse antes de la extracción. Una de las diferencias respecto a la SPME manual con fibras es que en la SPME en tubo no es posible el desacoplamiento entre la desorción y la inyección. La desorción se lleva a cabo por la fase móvil o aspirando un disolvente de desorción de un segundo vial. Una de las ventajas de la SPME en tubo respecto a la de fibras es el hecho de que el número de columnas capilares con fases estacionarias diferentes es ilimitado y que el efecto memoria es inapreciable. El principal inconveniente de la SPME en tubo es que sólo puede

aplicarse a muestras limpias para no obstruir el capilar y que sean miscibles con la fase móvil (Peñalver, 2003).

Por tanto, teniendo en cuenta lo expuesto y que el principal objetivo sería el análisis de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía de gases, las prestaciones técnicas del método de SPME en fibras son las más idóneas para el diseño del método de estudio. En un primer paso, habrá que establecer la fibra a utilizar en los ensayos y las condiciones extractivas más favorables.

En cuanto a los parámetros que influyen en el proceso, la eficacia de la extracción (SPME) puede mejorarse mediante la optimización de las variables experimentales de las que depende el proceso. Entre estas variables cabe destacar la agitación de la muestra, que favorece la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra o al espacio de cabeza. Con esto se consigue reducir el tiempo necesario para alcanzar los distintos equilibrios (muestra-espacio de cabeza, espacio de cabeza-fibra). Aspecto especialmente importante para los analitos con mayor peso molecular (Cháfer, 2006).

El tiempo de extracción es un parámetro muy importante en el proceso de extracción (ya sea por absorción o a través de la adsorción). Cada par analito-fibra tiene un tiempo de equilibrio determinado, a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante e invariante en el tiempo. El tiempo de equilibrio se relaciona con el coeficiente de difusión de forma inversamente proporcional. Sin embargo, este tiempo puede ser muy largo, por lo que en algunos casos se elige trabajar en condiciones determinadas de no equilibrio. Para la identificación del analito la condición de equilibrio no es un punto clave, mientras que si lo es para la cuantificación. En condiciones de no equilibrio el tiempo de extracción se debe controlar estrictamente, ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo pueden dar lugar a variaciones significativas en la cantidad de analito extraída y por tanto a errores en su cuantificación (Cháfer, 2006).

La temperatura de extracción es otro de los factores que influyen en el proceso de extracción. Así, una mayor temperatura favorecerá el paso de la matriz al espacio de cabeza y de éste a la fibra, pero hay que tener en cuenta que temperaturas demasiado elevadas pueden dar lugar a la desorción parcial de los analitos por la fibra. Por ello, es importante realizar ensayos a distintas temperaturas de muestreo. Por otro lado, hay que establecer la temperatura y el tiempo para la desorción de los analitos en el inyector del CG.

El efecto del volumen de la muestra indica de forma general que a mayor volumen de muestra, mayor cantidad de analito extraída en la fibra. Esto no queda tan explícito para compuestos con valores de K (coeficiente de partición entre la muestra y la fibra) pequeños. Por otra parte los compuestos volátiles y semivolátiles suelen tener valores de K elevados por lo que podemos estar en el entorno de la generalidad arriba definida.

El efecto del pH depende del tipo de compuestos, creando reacciones diversas en la fase de extracción, por tanto los analitos deberían estar en forma neutra para su extracción. Esto no es siempre posible y menos aún en la fase de diseño del método en la que nos encontramos.

Parece lógico diseñar el estudio de forma que el muestreo de la muestra por la fibra se realice en condiciones lo más similares posibles al proceso natural en el que el insecto lo detecta en el hábitat. Por tanto, la muestra será un sólido introducido en un recipiente cerrado para facilitar el muestreo en el espacio de cabeza y sometiendo dicho espacio a agitación magnética (para facilitar la presencia de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza y su homogenización) evitando que el proceso de agitación suponga una alteración de la muestra. La extracción se proyecta en espacio de cabeza pues los analitos a identificar, como hemos indicado anteriormente, son compuestos volátiles o semivolátiles. Los tiempos de exposición han de ser largos, para facilitar la extracción del mayor rango de analitos posibles. Se prevé por tanto un tiempo de exposición mínimo de 45 minutos. La temperatura adecuada en el proceso de extracción ha de ser establecida experimentalmente ya que la

temperatura óptima de fructificación del hongo es de 14 °C y está, a priori, resultaría baja para realizar el muestreo por SPME.

En el desarrollo de la metodología de análisis se ha contado con la colaboración del Departamento de Medioambiente de la Unidad Química Medioambiental del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de Madrid.

Los análisis se están llevando a cabo gracias a la colaboración con el Departamento de Ingeniería Forestal, Unidad de Análisis Instrumental y Operaciones Básicas de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid.

El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard HP 5890 Series GC con las siguientes características:

- Voltaje: 120/200/220/240
- Rango: +5, - 10%
- Frecuencia: 47.5 – 66 Hz
- Consumo: 2200 VA max
- “Output” (salida): 7500 Btu/hr max
- Rango de operación: 0-55°C ambiente (20-27 °C optimo) 5-95% humedad (50-60% optimo).
- Cinco zonas térmicas de trabajo: Dos detectores, dos entradas (“inlets”) y un auxiliar.
- Métodos de almacenamiento: Dos
- Rango Precisión: 0-35 sccm [sccm = standard cc/minute], ± 3 sccm de He y H₂, ± 5 sccm de N₂ y ArCH₄.
- Rango ampliado: 100-150 sccm, Precisión ± 15 sccm

2.12.1 Toma de muestras.

Toma de muestras, microextracción en laboratorio:

- Se seleccionan carpóforos en estadio L₂ y L₃ de las fincas de estudio.
- Se extrae el carpóforo al completo separándolo del micelio.

- En otras muestras, dependiendo del protocolo elegido, con un bisturí se practican secciones radiales para obtener el sector que se tomara como muestra, desechándose el resto del carpóforo. Se practicarán cuantas secciones radiales sean necesarios siempre que estas se practiquen sobre el eje longitudinal de la muestra, hasta conseguir el sector del tamaño deseado. Las muestras obtenidas deben contener porciones de todas las cutículas y tejidos internos de los que se compone (pues desconocemos a priori las células que generan el atrayente buscado) (Señoráns, 2013).

Para elegir el método óptimo de muestreo se contemplan ensayos experimentales previos que tomen el carpóforo íntegro y serán comparados con los resultados de análisis de muestras fraccionadas, hasta poder elegir entre ambos procedimientos.

- Las muestras se procesaran en laboratorio en el menor tiempo posible. De no ser así debe manipularse de la siguiente forma: Se congelan de forma inmediata a temperatura de -15 °C. Se descongelan a temperatura de 3 °C durante 30 min. Se procesan de forma inmediata.

Existe la posibilidad de que la muestra, al ser extraída del hongo, no emita este atrayente para lo que se plantea paralelamente a los ensayos de laboratorio, una extracción de aromas en campo.

Toma de muestras, microextracción en campo:

- Se localiza en las fincas de muestreo un ejemplar en el estadio evolutivo L₂ ó L₃.

- Con un bisturí se practicará una o más secciones sobre el eje longitudinal radial de la muestra para obtener las muestras a analizar. Para elegir el método óptimo de muestreo se contemplan ensayos experimentales previos que tomen el carpóforo íntegro, sin practicar cortes en el mismo, y serán comparados con los resultados de análisis de muestras fraccionadas, hasta poder elegir entre ambos procedimientos.

- Se expone la fibra con la embocadura sobre la muestra, dejando una separación entre el extremo de la fibra y la cutícula exterior de < 1 cm, espacio de cabeza limitado por el propio diseño de la embocadura.
- Se fija el dispositivo el tiempo correspondiente al tiempo de exposición para la fibra.
- Una vez finalizado el tiempo de muestreo. La aguja con la fibra retraída se protege con un septum y se introduce el conjunto en un tubo cerrado que será refrigerado y trasladado al laboratorio para su análisis inmediato.

2.12.2 Elección del tipo de fibra.

Para la elección del tipo de fibra, actualmente, existen diversos tipos de fases estacionarias en el mercado, con diferentes espesores y polaridades que muestran afinidades por diferentes analitos el polidimetilsiloxano (PDMS), las de poliácrlato (PA) y fases mixtas como son las de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB); polietilenglicol/divinilbenceno (Carbowax/DVB), y Carboxen/PDMS. Independientemente de la naturaleza del sorbente, las moléculas de los analitos alcanzan su superficie. El hecho de que migren hacia el interior del sorbente o se queden en la superficie depende de la magnitud del coeficiente de difusión del analito en el sorbente. La difusión de las moléculas orgánicas en PDMS es relativamente rápida, por tanto la difusión en PDMS se produce por absorción. Sin embargo, los coeficientes de difusión de las moléculas orgánicas en DVB y Carboxen son tan pequeños que, en el tiempo de análisis de la SPME, todas las moléculas permanecen en la superficie del sorbente. Estas moléculas orgánicas deberían permanecer en contacto con la capa durante un largo tiempo (días o semanas) para que difundieran hacia el interior del sorbente (distancias muy cortas). Esto se manifestaría durante el análisis en un persistente efecto memoria, difícil de eliminar incluso después de varias desorciones (Cháfer, 2006).

Las fibras de PA, en cambio, son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS. Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo que en general los tiempos de extracción son mayores para los compuestos volátiles en el espacio de cabeza. Las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo las de PDMS/DVB o CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, puesto que son polímeros sólidos. En general, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS. El principal inconveniente es el intervalo lineal dinámico, que es menor que en las fibras de absorción, y los problemas de desplazamiento que presentan (Giménez, 2012).

Algunas fases se comercializan con espesores diferentes (PDMS 7, 30 y 100 μ m) y esto afecta tanto al tiempo de equilibrio como a la sensibilidad del método. El uso de una fibra gruesa requiere un tiempo de extracción más largo pero las recuperaciones son generalmente mayores. El tiempo de extracción para que se alcance el equilibrio es independiente de la concentración de analito en la muestra. Las fases estacionarias están inmovilizadas sin enlaces, o bien están parcialmente o muy entrelazadas. Las fases no enlazadas son estables en algunos disolventes orgánicos miscibles con agua; sin embargo puede producirse una ligera hinchazón si se usa con disolventes no polares. Las fases enlazadas son compatibles con la mayoría de los disolventes orgánicos excepto con los no polares. Las fases parcialmente entrelazadas son estables en la mayoría de los disolventes miscibles en agua. Las fases muy entrelazadas son equivalentes a las parcialmente entrelazadas, excepto en que tienen algunos enlaces con el centro de la fibra.

Generalmente, la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax

(CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como PAHs o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) (Cháfer, 2006).

La reducción del espesor de la fibra de 100 μm a 7 μm limita su aplicación a un número más reducido de analitos pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas.

Varios tipos de fibras pueden resultar adecuados para el análisis de los compuestos de interés. Para el diseño del método de análisis que se realiza, según los pocos datos que tenemos sobre el analito, nos movemos entre las fibras propuestas para analitos volátiles. Se eligen cuatro tipos de fibra pensados para cubrir mayor rango de compuestos con estas características:

- ✓ 100 μm PDMS
- ✓ 85 μm PA
- ✓ 65 μm PDMS/DVB
- ✓ 85 μm Carboxen/PDMS

El diagrama de la figura nº 26 atiende a los criterios de esta elección.

Fig.26. Esquema de las características de algunas de las fibras para SPME. El círculo rojo muestra el rango en el que está el caso de este análisis.

2.12.3 El método de análisis de analitos por CG-MS.

Como hemos indicado anteriormente, en la mayor parte de las aplicaciones de la SPME descritas hasta este momento para el análisis de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles esta técnica es acoplada a la cromatografía de gases (CG) y en el caso de desconocer la identidad de los compuestos a analizar, como es este caso, esta va acoplada a un detector de espectrometría de masas (Peñalver, 2002).

Los compuestos se desorben térmicamente en el inyector del cromatógrafo ya que, como se ha comentado, con la temperatura los compuestos disminuyen su afinidad por la fibra, y los analitos son introducidos en la columna analítica por el gas portador.

Para los análisis cromatográficos se utilizará una columna capilar no polar de 30 metros y un programa inicial de temperatura de horno lento que facilite la separación de los compuestos con una temperatura inicial baja (unos 50°C).

Los distintos parámetros implicados deben ser optimizados para conseguir una adecuada separación de los compuestos en el menor tiempo posible. Los análisis se llevarán a cabo utilizando una temperatura alta en el inyector, para facilitar la desorción de los compuestos, que vendrá condicionada por el tipo de fibra utilizada.

2.13. Referencias bibliográficas en el Capítulo 2.

Allue Andrade, J.L. (1997). Atlas fitoclimático de España. *Taxonomías. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*, 200-221.

Ammirati, J.F. (1987). Spatial and temporal distributions of ectomycorrhizal fungi in a Douglas-fir plantation. *Mycorrhizae in the Next Decade, 7th NACOM*. IFAS, University of Florida, Gainesville, USA, 81.

Arnold, C. (1960). Maximum-minimum temperatures as a basis for computing heat units. *American Society for Horticultural Science*, 76, 682-692. *Rapid estimation of heat accumulation from maximum and minimum temperatures. Ecology*, 50, 514-517.

Beck, S D. (1965). Resistance of plants to insects. *Annual Review Entomology*, 10, 207-232.

Ballard, T.M. (2000). Impacts of forest management on northern forest soils. *Forest Ecology Management*, 133: 37-42.

Beck, S D. (1965). Resistance of plants to insects. *Annual Review Entomology*, 10, 207-232.

Bernays, E.A. (2000). Plant-insect interactions- A synthesis. *Abstract Book I. XXI International Congress of Entomology. Brazil. Plenary Lectures VIII-XIII*. 125-150.

Blum, MS. (1981). Chemical defences of Arthropods. *Academy Press*, 562.

Brill, E.J. (1989). Keys to the insects of the European part of the USSR. Volume II-Hymenoptera. Academy of Sciences of the USSR, Institute of Zoology. *Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd.*, New Delhi, 1995, 401-428.

- Buckland, S. T., Anderson, D. R., Burnham, K. P., y Laake, J. L. (1993). Distance sampling: estimating abundance of biological populations, *Springer Netherlands*, 250-446.
- Burns, T.D. (1984). Insect mycophagy in the Boletales: fungivore diversity and the mushroom habitat. *Fugus-Insect relationships. Perspectives in Ecology and Evolution*, Columbia University Press, USA, 91-129.
- Calvo-Bado, L. (2001). Sistemática del género *Pleurotus* con énfasis en las especies cultivadas. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. *Editorial LIMUSA, México*, 71-79.
- Calonge, M., Pérez-Pertrejo, Y., Ordóñez, C., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., y Ordóñez, D. (2002). Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y confirmación por espectrometría de masas. *Revista de Toxicología*, 19(2), 55-60.
- Cháfer Pericás, C. (2006). Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía. Tesis Doctoral. Servei de Publicacions Universitat de Valencia, 19-54.
- Chandler, A.E.F.(1969). Locomotory behaviour of first instar larvae of aphidophagous Syrphidae (Diptera) after contact with aphids. *Animal Behaviour*, 17(4), 673-678.
- Chandler, P. J. (1977). Studies of some fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae) including nine additions to the British list. *Systematic Entomology*, 2(2), 67-93.
- Chandler, P. J. (1994). *Rymosia* Winnertz (Diptera: Mycetophilidae), a newly recognised element of wetland faunas, with five species new to Britain and a key to species. *Entomologist's Gazette*, 45, 199-220.
- Craig, D. A. (1974). The labrum and cephalic fans of larval Simuliidae (Diptera: Nematocera). *Canadian journal of zoology*, 52(1), 133-159.
- Dallai, R., Lupetti, P., Afzelius, B. A., y Mamaev, B. (1995). Characteristics of the sperm flagellum in fungus gnats (Insecta, Diptera, Mycetophiloidea). *Zoomorphology*, 115(4), 213-219.
- De Liñán, C. y De Liñán, V. (2014). Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales 2014. *Mundiprensa Libros, Madrid*, 740.

Dethier, VG ; Barton Brown, L ; Smith , C.N. (1960). The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from Insects *Journal of Economic Entomology*, 53,134-136.

Duran Garcia, D. C. (2013). Desarrollo de un método rápido para analizar volátiles en plantas aromáticas por microextracción en fase sólida en modo headspace, asistida por la radiación de microondas. *Tesis Doctoral. Universidad Industrial de Santander*, 125-130.

Durán Guerrero, E. (2009). Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del vinagre de Jerez. *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz*, 43-89.

Edwards, F.W. (1925). British Fungus gnats (Diptera, Mycerophilidae). With a revised Generic Classification of the Family. *Transaction of the Entomological Society of London*, 1924, 505-670.

Fernández Toirán, M., Ágreda, T., Olano, J.M., (2006). Stand age and sampling year effect on the fungal fruit body community in Pinus pinaster forests in central Spain. *Canadian Journal of Botanic*, 84, 1249-1258.

Fisher, R.A. (1935). The Design of Experiments. *Edinburgh and London: Oliver and Boyd. Hafner Publishing Company. 8nd edn, 1971, New York*, 13-25.

Frankland, JC. (1992). Mechanisms in fungal succession. In: CarrollGC, Wicklow DT, eds. The fungal community, its organization and role in the ecosystem, 2nd edn. *Nueva York, USA: Marcel/Dekker, Inc.* 383–401.

Galum, R. Grothilf, S. y S. Blondheim, (1968). Gli effetti fago- stimolatori degli idrolizzati proteici e il loro ruolo nel controllo della mosca mediterranea della frutta. *Atti, Reunioni congiunta dei grupo de laboro OILB, Sassari Itali*, 1978,16-35.

Gandullo, J.M.; Serrada, R. (1987). Mapa de productividad potencial forestal de la España peninsular 1:1.000.000. 2ªed. *I.N.I.A.-M.A.P.A. Madrid*

Garbaye, J., Le Tacon, F. (1982). Influence of mineral fertilization and thinning intensity on the fruit body production of epigeous fungi in an artificial spruce stand (*Picea excelsa* Link) in North-Eastern France. *Acta Oecologica. Oecologia applicata*, 3, 153-160.

Garbaye, J., Le Tacon, F. (1986). Effects de la mycorhization contrôlée après transplantation. *Revue Forestière Française*, 38, 258-263.

García de Viedma, M. (1964). Contribución al conocimiento de la tribu Cneorhinini. Revisión de los géneros *Attactagenus* Tournier y *Philopeton* Stephens y consideraciones acerca de *Cneorhinus* Schöenherr, *Leptolepurus* Desbrochers y *Bletonius* Hoffmann (Col., Curculionidae). *Eos*, XL, 455-493.

Gardner, J.H., Malajczuk, N. (1988). Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in western Australia by mycorrhizal fungi. *Forest Ecology Management* 24: 27-42.

Giménez, A. (2012). Captura y caracterización de compuestos aromáticos volátiles en alimentos cocinados: estudio preliminar. Proyecto fin de carrera. Cartagena. Escuela Técnica de Industriales, Universidad Politécnica de Cartagena. 23-25.

Hackman, W. y Meinander (1979). Reproductive and developmental strategies of fungivorous *Pegomya* species (Diptera, Anthomyiidae). *Alquilo Serie Zoológica*, 20, 62-64.

Hanski, I. (1989). Fungivory: fungi, insects and ecology. *Insect-fungus interactions*, 25-68.

Hering, T.F. (1966). The terricolous higher fungi of four lake district woodlands. *Trans. Britain Mycology Society*, 49, 369-383.

Hernández-Ortiz, V., Morales, I., y Vergara, C. (2004). Detección de poblaciones de *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) durante la fructificación de *Crataegus mexicana* (Rosaceae) en Puebla, México. *Acta Zoológica Mexicana (ns)*, 20(1), 119-129.

Hilton, R.N., Malajczuk, N., Pearce, M.H. (1989). Larger fungi of the Jarrah forest: An ecological and taxonomic survey. In: Dell, B., Havel, J.J., Malajczuk, N. (Ed.), *The Jarrah Forest. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, 89-109

Hiukko, E. (1978). Helttasiaten itioemen kasvunopeudesta. *Sienilehti*, 30, 40-42.

Hora, F.B., (1959). Quantitative experiments on toadstool production in woods. *Trans. British Mycology*, 1-14.

Hunt, G.A., Trappe, J.M. (1987). Seasonal hypogeous sporocarp production in a western Oregon Douglas-fir stand. *Canadian Journal of Botany*, 65, 438-445.

Ipertí, G. (1983). Vers une amelioration de la lutte integree dans les agro-systemes mediterranees menacés simultaneament par les mouches de fruits et les homopteres. *Fruit Flies of Econocmic Importance*. CEC, AA. Balkema, Torrerdan, 56-59.

Jiménez-Ramírez, J.R. (2009). Conferencia sobre *Pleurotus eryngii*. Sociedad micológica de Madrid (on-line). Actualizada: 09/09/2004. [Fecha de consulta: 07/010/2014]. Disponible en: <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias19.html>

Jones, M.D., Durall, D.M., Cairney, J.W.G. (2003). Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytology*, 157, 399-422.

Keilin, D. (1944). Respiratory systems and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. *Parasitology*, 36(1-2), 1-66.

Kjærandsen, J. (1993). Diptera in mines and cave systems in southern Norway *Entomology Fennica*, 4, 151-160

Kjaerandsen, J. (2005). A review of fungus gnats in the tribe Exechiini (Diptera, Mycetophilidae) from the JW Zetterstedt collection at the Museum of Zoology in Lund, Sweden. *Zootaxa*, 856, 1-35.

Kjaerandsen, J. (2006). Review of fungus gnats of the genus *Tarnania* Tuomikoski, with a phylogeny of the *Rymosia* sl genus group (Diptera: Mycetophilidae). *Insect Systematics & Evolution*, 37(2), 121-148.

Kjaerandsen, J. (2011) *Tarnania Fenestralis* General Description. Fungus Gnats (One-line). Actualizada: 02/05/2010. [Fecha de consulta: 05/09/2013]. Disponible en: <http://sciaroidea.info/>

Kjærandsen, J., y Jordal, J. B. (2007). Fungus gnats (Diptera: Bolitophilidae, Diadocidiidae, Ditomyiidae, Keroplatidae and Mycetophilidae) from Møre og Romsdal. *Norwegian Journal of Entomology*, 54, 147-171.

Krivosheina, M.G. (2010). Key to genera of larvae of the fungus gnat subfamily Mycetophilinae (Diptera: Mycetophilidae) of Russia and adjacent countries. *Russian Entomological Journal*, 19 (4): 327-340.

Kruskal, W. H., y Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.

Låmas, T., Fries, C., (1995). An integrated forest inventory in a managed north Swedish forest landscape for estimating growing stock and coarse woody debris. In: Köhl, M. (Ed.), *Proceedings of the Monte Verità conference on forest survey desingns. Swiss Fed. Inst. for Forest, Snow and Landscape Res. Birmensdorf. Swiss Fed. Inst. of Tech., Zürich, Switzerland*, 296-311.

Lastovka, P. (1970). A contribution to the larval morphology of the genera Platurocypta and Dynatosoma (Diptera, Mycetophilidae). *The Entomologist*, 105, 59-76.

Laštovka, P. (1971). A study on the last instar larvae of some Czechoslovak Mycetophila (Diptera: Mycetophilidae). *Acta University Carolina, Biology*, 1970, 137-176.

Latheef, M. A., y Harcourt, D. G. (1972). A quantitative study of food consumption, assimilation, and growth in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on two host plants. *The Canadian Entomologist*, 104(08), 1271-1276.

Lawrence T., (1997) On the meaning and use of kurtosis. *Psychological methods*, 2(3), 292.

Le Tacon, F., Lamoure, D., Guimberteau, J., Fiket, C. (1984). Les symbiotes mycorrhiziens de l'Épicéa commun et du Douglas dans le Limousin. *Revue Forestière Française*, 36, 325-338.

Levene, H. (1960). In Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling, I. Olkin et al. eds., *Stanford University Press*, 278-292.

Lewis, W. J. (1970). Study of Species and Instars of Larval *Heliothis* 1 Parasitized by *Microplitis croceipes* 2, 3. *Journal of economic entomology*, 63(2), 363-365.

Liedo, P. (1989). Trampeo: tipos de trampas, atrayentes y principios de atracción. *Memoria. Curso sobre Control Moscas de la Fruta. Quito (Ecuador)*. 24-27 Oct 1989, 12-15.

Luoma, D.L., Frenkel, R.E., Trappe, J.M. (1991). Fruiting of hypogeous fungi in Oregon Douglas-fir forests: seasonal and habitat variation. *Mycology*, 83, 335-353.

M.A.P.A. (1980). Agricultural and Land Use Map E 1:50.000. Sheet 403: 19-16, ed. DG. *Plant production, Ministry of Agriculture. Madrid.*

Madwar, S. (1937). Biology and morphology of the immature stages of Mycetophilidae (Diptera, Nematocera). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 227(541), 1-110.

Magro, R. (2002). Técnicas de preparación microscópica, tinción e inclusión para dermatopsias en los lepidópteros (Insecta: Lepidoptera). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa (versión digital ARACNET-10)*, 31, 205–216.

Majer, K. (1990). A revision of the genus *Parathrix* Majer, 1989 (Col., Melyridae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, Berlin, 37(1-3), 15-21.

Makeenko, P. E. (1986). Biology and morphological changes in the process of larval development in the fungus gnats *Allodia ornaticollis* and *A. lugens* (Diptera, Mycetophilidae). *Zoologicheskii zhurnal*, 65(1), 76-86.

Marco, V. (2001). Modelización de la tasa de desarrollo de insectos en función de la temperatura. Aplicación al manejo integrado de plagas mediante el método de grados-día. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 28, 147-150.

Mareggiani, G. (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas*, 60, 22-30.

Mareggiani, G; Pelicano, A; Fraschina, A; Bilotti, G; Gorosito, N ; Zipeto, G. (1996) . Actividad in vitro de productos naturales de origen vegetal sobre larvas de *Meloidogyne incognita* (Nematoda, Meloidogynidae). *Revista Facultad de Agronomía (Argentina)* 16 (3), 141-145.

Martínez-Peña, F., Fernández Toirán, M., (1997). Producción de especies fúngicas en masas de *Pinus sylvestris* L. de diferentes edades. *Actas Congreso Forestal Hispano Luso. IRATI. Pamplona*. 56-59.

Martínez-Peña, F., Giner García, M., Tejedor Yagüe, C., Campo Macho, J., Francés Peñuelas, D., Muñoz Yagüe, E., y España, S. (2003). Primeros resultados del estudio de aprovechamiento micológico a partir de encuestas en la zona MYAS (Soria): Recolección, Micoturismo y Ordenación del Recurso. *Actas del I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada. Soria. Mayo 2003*, 27-35.

Martínez-Peña, F., Rondet, J. (2008). "Micosylva": Gestión selvícola de montes productores de hongos silvestres comestibles de interés socioeconómico como funete de desarrollo rural. Proyecto SUDOE, Cod. SOE1/P2/E069. Web del proyecto: <http://www.micosylva.com>

Mehus, H. (1986). Fruit Body Production of Macrofungi in Some North Norwegian. Forest Types *Nordway Journal Botany*, 6, 679-702.

Michelt Tripod, A. (2010). Elementos de estadística para el estudio de mercado (One- line) Actualizado: desconocido. [Fecha de consulta: 25/02/2011]. Disponible en: <http://michelt.tripod.com/Elemest/Elemest.html>

Modi, G. B., y Tesh, R. B. (1983). A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of medical entomology*, 20(5), 568-569.

Navarro, T., de Lorenzo, C., Pérez, R.A. (2004). SPME analysis of volatile compounds from unfermented olives subjected to thermal treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (5-6), 812-817.

Nordlung, D.A., Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2, 211-220.

Ohenoja, E., Koistinen, R. (1984). Fruit body production of larger fungi in Finland. Edible fungi in northern Finland. *Annal Botanica Fennica*, 21, 357-366.

Parker-Rhodes, A.F. (1951). The basidiomycetes of Skokholm Island (7). Some floristic and ecological calculations. *New Phytology*, 50, 227-243.

Peck, S. B. (1988). A review of the cave fauna of Canada, and the composition and ecology of the invertebrate fauna of caves and mines in Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 66(5), 1197-1213.

Peñalver, A., García, V., Pocurull, E., Borrull, F., y Marcé, R. M. (2003). Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1007(1), 1-9.

Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., y Tadeo, J. L. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2633-2637.

- Perusquía Ortiz, J. (2012). Funcionamiento e instalaciones propias de un laboratorio de entomología. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(19), 35-45.
- Phillips, D. M. (1970). Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 44(2), 243.
- Plassmann, E. (1972). Morphologisch-taxonomische Untersuchungen an Fungivoridenlarven. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 19, 73-99.
- Prota, R. (1982). Evaluation and prospects of Integrated Control Programs Fruit Flies of Economic Importance. *CEC, AA. Balkema. Rotterdam*, 2, 45-85.
- Quinn, G. P., y Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for biologists. *Cambridge University Press*, 473-495.
- Ribeiro, E. (1990). Contribution to the study of fungus-gnats (Diptera: Mycetophylloidea) of Portugal. II-Seven new records. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, 118, 175-194.
- Richards, O.W., y Davies, R.G. (1983). Tratado de entomología Imms: Clasificación y biología. *Omega*, 602-625.
- Richardson, M. (1970). Studies of *Russula emetica* and other agarics in a Scots pine plantation. *Trans. British Mycology Society*, 55, 217-229.
- Rindal, E. y Sølvi, G. E. (2006). Phylogeny of the subfamily Mycetophilinae (Diptera: Mycetophilidae). *Zootaxa*, 1302, 43-59.
- Rindal, E., Sølvi, G. E., Kjærandsen, J., y Bachmann, L. (2007). Molecular phylogeny of the fungus gnat tribe Exechiini (Mycetophilidae, Diptera). *Zoologica Scripta*, 36(4), 327-335.
- Rindal, E., Sølvi, G.E. y Bachmann, L. (2009). Molecular phylogeny of the fungus gnat family Mycetophilidae (Diptera, Mycetophiliformia). *Systematic Entomology*, 34(3), 524-532.
- Rivas Martínez, S., Gandullo Gutierrez, J.M., Allué Andrade, J.L.; Montero de Burgos, J.L. y González Rebollar, J.L. (1987). *Memoria del Mapa de Series de Vegetación de España. 1:400.000. M.A.P.A.-I.C.O.N.A. Madrid*.

Rivas-Martínez, S. (1987). Memory Spanish vegetation series maps E 1:400.000. *Sheet 13*, ed. I.C.O.N.A-M.A.P.A. Madrid.

Roesch, F.A.J., 1993. Adaptive cluster sampling for forest inventories. *Forest Sciences*, 39, 655-669.

Ross, D. H. y Merritt, R. W. (1978). The larval instars and population dynamics of five species of black flies (Diptera: Simuliidae) and their responses to selected environmental factors. *Canadian journal of zoology*, 56(8), 1633-1642.

Russel-Smith, A. (1979). A study of fungus flies (Dipteral Mycetophilidae) in beech woodland. *Ecological entomology*, 4(4), 355-364.

Salkind, N. J. (1999). Métodos de investigación. *Pearson Educación*, 97-102.

Santos, M. (1993). Diseño experimental. Apuntes de Biología. 2º Ciclo (On-line). Actualizada: 1999-2000. [Fecha de consulta: 23/06/2010]. Disponible en: <http://ddd.uab.cat/pub/procur/1999-00/p24899a1999-00.pdf>. 27/05/2011.

Šedivý, J., y Ševčík, J. (2003). Ichneumonid (Hymenoptera: Ichneumonidae) parasitoids of fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae): rearing records from the Czech Republic. *Studia dipterologica*, 10(1), 153-158.

Señoráns, F.J. (2013). Nuevas técnicas de preparación de la muestra: MAE, ASE, SFE, SPE y SPME. *Área de Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid (On-line)*. Actualizado: 01/03/2010. [Fecha de consulta: 15/12/2013]. Disponible en: <http://www.uam.es/otros/gruta/Research/Principal.htm>

Sevcik, J. (2001). A new species of Dynatosoma, fourteen new synonyms and other data on fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae) from central and northern Europe. *Studia dipterologica*, 8(1), 143-152.

Sformo, T., Kohl, F., McIntyre, J., Kerr, P., Duman, J. G. y Barnes, B. M. (2009). Simultaneous freeze tolerance and avoidance in individual fungus gnats, *Exechia nugatoria*. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(7), 897-902.

Smith, K.G. (1989) An introduction to the immature stages of British flies. *Royal Entomological Society of London. Handbooks for the Identification of British Insects*, 10, Part 14.

Soli, G. E. (1997). The adult morphology of Mycetophilidae (s. str.), with a tentative phylogeny of the family (Diptera, Sciaroidea). *Entomologica scandinavica*, 5-55.

SPSS Inc, (2006). Statistical Package for the Social Sciences. *SPSS developersworks. The American University in Cairo, Department of University Academic Computing Technologies (UACT)*, 5-18.

Strullu, D.G. (1991). Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. *Technique et Documentation. Lavoisier, Paris*, 159-185.

Thompson, R. W. (1930). An Outbreak of Mycetophilid and Chironomid Larvae in a large commercial Greenhouse. *60th Annual Report of the Entomological Society of Ontario 1929*, 96-99.

Thompson, S.K. (1990). Adaptive cluster sampling. *JASA*, 85, 1050-1059.

Trofymow, J.A., Addison, J., Blackwell, B.A., He, F., Preston, C.A., Marshall, V.G. (2003). Attributes and indicators of old-growth and successional Douglas-fir forest on Vancouver Island. *Environmental Review*, 11, 187-204.

Tuomikoski, R. (1996). Generic taxonomy of the Exechinii (Diptera: Mycetophilidae). *Annales Entomologici Fennici* 32, 159-194.

Vargas, R. I., Walsh, W. A., Jang, E. B., Armstrong, J. W. y Kanehisa, D. T. (1996). Survival and development of immature stages of four Hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Annals of the Entomological Society of America*, 89(1), 64-69

Vázquez, X. (1993). Coleoptera Oedemeridae, Pyrochroidae, Pythidae, Mycterida. *Fauna Ibérica 5. Consejo Superior de Investigaciones Científicas*: 181.

Villanueva-Sánchez, E., Ibáñez-Bernal, S., Lomelí_Flores, J.R. y Valdez-Carrasco, J. (2013). Identificación y caracterización de la mosca negra *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae) en el cultivo de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) en el centro de México. *Acta zoológica mexicana*, 29(2), 363-375.

Wagner, T.L., Wu, H., Sharpe, P. J. H., Schoolfield, R. M. y Coulson, R. N. (1984). Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. *Annal Entomological Society of America*, 77, 208-225.

Warren, W.G., Olsen, P.F. (1964). A line intersect technique for assessing logging waste. *Forest Science*, 10, 267-276.

Wilkins, W.H., Patrick, S.H. (1939). The ecology of the larger fungi. III. constancy and frequency of grassland species with special reference to soil types. *Annals of Applied Biology*, 26, 25-46.

Yélamos, I. (1990). Preparación de genitales de insectos. *Boletín 8/B08. SEEA entomológica*, 012-035.

Zaitzev, A.I. (1993). New and Little known fungus gnats of the Genus *Rymosia* Winn. from Russia and middle Asia. *Geir E.E.Soli. Lambillionea*, XCIII, 2 Juin. 211-218.

Zaitzev, A. I. (2003). Fungus gnats (Diptera, Sciaroidea) of the fauna of Russia and adjacent regions. *Part II. Int. J. Dipterol. Res*, 14(2-4), 77-386.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Prevalencias de parasitación.

Se representan gráficamente los datos obtenidos al analizar semanalmente la calidad de las recolecciones de *Pleurotus eryngii*.

La temporada otoñal de seta de cardo, para la zona dónde se realiza el estudio, se estima con una duración de 2,8 meses. Durante el año 2006 se estudia la prevalencia de parasitación en las fincas de estudio durante un periodo de cuatro semanas y, en el año 2007 durante ocho semanas. Un total de 6209 carpóforos en estado adulto ó L₃ fueron analizadas según la metodología descrita anteriormente.

Además, un total de 255 setas clasificadas como no parasitadas fueron sometidas a cuarentenas para verificar esta primera clasificación, basada en un método visual.

En el siguiente gráfico (Fig.27) se muestra el total de recolecciones de las tres fincas de muestreo clasificadas según el grado de parasitación o agusanamiento:

Fig.27. Gráfico resumen de las recolecciones semanales realizadas en las fincas de muestreo, clasificando los carpóforos según grados de agusanamiento.

Las muestras A, B, C y D corresponden a las setas recolectadas durante la temporada 2006; las muestras 0,1,2,3,4,5,6 y 7 corresponden a las recolecciones semanales durante la temporada 2007. El trazo azul ó Ga₁ son los carpóforos catalogados como limpios de galerías de parásitos y Ga₂, Ga₃ y Ga₄ los carpóforos afectados por parasitaciones en “poco”, “algo” o “mucho” grado de agusanamiento respectivamente, clasificación que se detalla en el apartado 2.1. del capítulo 2, material y métodos.

En este estudio se considera que el grado de agusanamiento Ga_3 , “carpóforo bastante agusanado”, sería el umbral de ascos para el consumo, tal y como se detalla en la metodología. Por tanto, los carpóforos clasificados como Ga_3 más los carpóforos clasificados como Ga_4 , “muy agusanado” suponen un porcentaje de la recolección que se desecha en el momento de la recogida.

La evolución de las larvas no se ve afectada por la extracción del carpóforo del sustrato, por ello, si no es consumida de inmediato, al cabo de unas horas todos los parasitados pasan a ser desechables, por éste motivo, pongamos que al día siguiente de la recogida, prácticamente toda la recolección salvo la clasificada como Ga_1 ó “limpia de galerías”, independientemente de su grado de agusanamiento mostrado en el momento de recogerse, no se consumiría.

En este estudio se recogen para la temporada del 2006 un 14,14% de carpóforos parasitados por dípteros micófagos, de los cuales el 10,5% se desearía en el momento de la recolección y, en la temporada del 2007, se encontraron parasitados el 22,8% de los cuales un 19,3% se desearía recién recogido.

Seguidamente se muestra el análisis estadístico de las series obtenidas que define la Prevalencia de parasitación a la que ha estado sometida la población de hongos de las fincas de estudio:

Registro de índices de infestación de dípteros endoparásitos en carpóforos adultos de *P. eryngii* (Tab.1):

Muestreos	Finca	Nº carpóforos Recolectados	Nº carpóforos Limpios en campo	Nº carpóforos Parasitados en campo	% carpóforos Parasitados en campo		
Muestreo A- 12/10/2006	Finca 0	114	100	14	12.28		
	Finca 1	262	235	27	10.30		
	Finca 2	429	349	80	18.64		
Muestreo B- 27/10/2006	Finca 0	285	250	35	12.28		
	Finca 1	427	335	92	21.54		
	Finca 2	312	239	73	23.39		
Muestreo C- 15/11/2006	Finca 0	529	435	94	17.76		
	Finca 1	383	335	48	12.53		
	Finca 2	495	400	95	19.19		
Muestreo D- 08/12/2006	Finca 0	103	100	3	2.91		
	Finca 1	96	90	6	6.25		
	Finca 2	78	73	5	6.41	Resultados de las cuarentenas:	Carpóforos que tras la cuarentena resultaron estar parasitados (%)
Muestreo 0- 19/10/2007	Finca 0	43	40	3	6.97	15 limpios	0
	Finca 1	85	83	2	2.35	15 limpios	0
	Finca 2	300	241	59	19.66	15 limpios	0
Muestreo 1- 28/10/2007	Finca 0	27	18	9	33.33	13 limpios y 2 parasitados	13.33
	Finca 1	353	334	19	5.66	14 limpios y 1 parasitado	6.66
	Finca 2	143	97	46	32.16	15 limpios	0
Muestreo 2- 04/11/2007	Finca 0	14	12	2	14.28	9 limpios y 1 parasitado	10.00
	Finca 1	111	106	5	4.50	8 limpios y 2 parasitados	20
	Finca 2	24	21	3	12.5	10 limpios	0
Muestreo 3- 11/11/2007	Finca 0	28	15	13	46.42	9 limpios y 1 parasitado	10.00
	Finca 1	39	25	14	35.89	10 limpios	0
	Finca 2	55	35	20	36.36	10 limpios	0
Muestreo 4- 18/11/2007	Finca 0	30	18	12	40	10 limpios	0
	Finca 1	54	40	14	25.92	10 limpios	0
	Finca 2	23	15	8	34.78	10 limpios	0
Muestreo 5- 25/11/2007	Finca 0	78	48	30	38.46	10 limpios	0
	Finca 1	144	108	36	25	10 limpios	0

Muestreos	Finca	Nº carpóforos Recolectados	Nº carpóforos Limpios en campo	Nº carpóforos Parasitados en campo	% carpóforos Parasitados en campo		
	Finca 2	314	243	71	22.61	10 limpios	0
Muestreo 6- 02/12/2007	Finca 0	85	60	25	29.41	13 limpios y 2 parasitados	13.33
	Finca 1	399	290	109	27.31	15 limpios	0
	Finca 2	127	100	27	21.25	15 limpios	0
Muestreo 7- 09/12/2007	Finca 0	85	60	25	29.41	14 limpios y 1 parasitado	6.66
	Finca 1	64	50	14	21.87	10 limpios	0
	Finca 2	71	61	10	14.08	10 limpios	0
		total: 6.209	total: 5.051	total: 1.158	total: 255		

Tab.1. Registro de índices de infestación de dípteros endoparásitos en carpóforos adultos de *Pleurotus eryngii* en las fincas de muestreo.

Se realiza el análisis de los principales estadísticos sobre los resultados de las cuarentenas:

Datos/Variable: % parasitación de carpóforos clasificados como limpios, tras el periodo de cuarentena: 24 valores con rango desde 0 a 20.0.

Fig.28. Gráfico de Cajas y Bigotes de la serie de datos obtenida del estudio de las cuarentenas de carpóforos limpios de larvas llevado a cabo. Se detecta un punto extremo en esta serie de datos.

En este gráfico (Fig.28) se aprecia un punto extremo en el que el 20% de las setas en cuarentena resultaron estar parasitados. Se trata de una cosecha con un bajo porcentaje de parasitación que puede resultar atípico según los

patrones de la evolución de las prevalencias de parasitación que muestran las praderas. Puede intuirse que exista en este punto un retraso en las puestas causado por factores externos por ejemplo datos de baja pluviometría que se registran en estas fechas¹⁶, de tal forma que aún no se aprecian visualmente las larvas existiendo puestas inmaduras en el interior de los carpóforos.

Por tanto, estadísticamente es más correcto realizar el análisis sin este dato: Datos/Variable: % parasitación de carpóforos clasificados como limpios, tras el periodo de cuarentena: 23 valores con rango desde 0 a 13.33.

Recuento	23
Promedio	2.60783
Desviación Estándar	4.70817
Coeficiente de Variación	180.54%
Mediana	0
Moda	0
Varianza	22.1669

Tab.2. Principales estadísticos de la serie de datos de las cuarentenas de carpóforos limpios de larvas realizado.

Fig.29 y Tab.3. Gráfico de Normalidad y estadísticos de análisis de normalidad de la serie de datos de las cuarentenas de carpóforos limpios de larvas realizado.

El Análisis de normalidad de la serie de datos obtenida del resultado de las cuarentenas indica que no provienen de una distribución normal (Fig.29 y Tab.3) por lo que únicamente se atenderá a los intervalos de confianza descritos para la media y no para la desviación estándar.

- Intervalos de confianza del 95.0% para la media: 2.60783 +/- 2.03597
[0.571855; 4.6438]

¹⁶ Fecha de detección del punto extremo: 04/11/2007, (registro pluviométrico pág.137).

Para el análisis estadístico de las prevalencias de parasitación únicamente se consideraran las parasitaciones identificadas visualmente en campo, sin considerar los resultados de parasitaciones definitivas que se verifican con una muestra representativa de la recolección, tras someterla al periodo de cuarentena. Del análisis independiente de estos datos se puede considerar un pequeño porcentaje adicional al mismo, considerando ahora los promedios resultantes de las cuarentenas (un 2,60% más de prevalencia en las parasitaciones, con un intervalo de ± 2.03597 al 95.0% probabilidad de confianza) pues, realizando inferencia estadística, se determina que la muestra sometida a cuarentenas si representa a la Población.

En cuanto al punto extremo detectado en el análisis estadístico de los resultados correspondientes a las cuarentenas, correspondiente al muestreo nº 2 con fecha del 4/11/2007, no tenido en cuenta para el análisis anterior, en este caso se va a transformar para utilizarlo en el análisis estadístico de los resultados correspondientes a las Prevalencias de parasitación: Debido a que se aprecia en campo un porcentaje muy bajo de parasitaciones (4.50 %) y el porcentaje que resulta de la muestra representativa de esta cosecha que es sometida a cuarentenas es inusualmente elevado (del 20%), cabría esperar que las puestas están presentes en los carpóforos recolectados pero que las larvas en este momento son imperceptibles visualmente por lo que se clasificaron en campo como limpios y, tras el periodo de cuarentenas, se descubre que están parasitados. Debido a esto, puesto que los resultados promedios de parasitaciones tras la cuarentena son del orden del 2.6 % y siendo la moda y la mediana de 0, se considerará el porcentaje de parasitación detectado en campo como el 17.7% en lugar del 4.50% que se pudo detectar entonces, resultado promedio de las parasitaciones en esta finca sin considerar el dato de este punto extremo. Por tanto, se analizan a continuación un total de 288 datos de campo sobre la calidad de los carpóforos en las praderas de estudio.

Se realiza el análisis de los principales estadísticos de las parasitaciones en cada una de las fincas muestreo, comprobando si se puede o no asemejar

los datos a las Distribución Normal y reflejando en su caso un intervalo de confianza ($p>0,05$) para la media y otro para la desviación estándar:

Finca 0. Datos/Variable: % L_3 parasitados en campo. 12 valores con rango desde 2.91262 a 46.4286 (Tab.4).

Recuento	12
Promedio	23.6294
Mediana	23.5906
Varianza	204.96
Desviación Estándar	14.3164
Coefficiente de Variación	60.5873%
Error Estándar	4.13279
Sesgo Estandarizado	0.17625
Curtosis Estandarizada	-0.983136

Tab.4. Principales estadísticos de la serie de datos del estudio de las prevalencias de parasitación realizado en la finca de muestreo n°0.

Finca 1. Datos/Variable: % L_3 parasitados en campo. 12 valores con rango desde 2.35294 a 35.8974 (Tab.5).

Recuento	12
Promedio	17.6974
Mediana	19.6228
Varianza	106.334
Desviación Estándar	10.3118
Coefficiente de Variación	58.2675%
Sesgo Estandarizado	0.0843009
Curtosis Estandarizada	-0.649504

Tab.5. Principales estadísticos de la serie de datos del estudio de las prevalencias de parasitación realizado en la finca de muestreo n°1.

Finca 2. Datos/Variable: % L_3 parasitados en campo. 12 valores con rango desde 6.41026 a 36.3636 (Tab.6).

Recuento	12
Promedio	21.757
Mediana	20.4633
Varianza	81.4337
Desviación Estándar	9.02406
Coefficiente de Variación	41.4766%
Error Estándar	2.60502
Sesgo Estandarizado	0.324185
Curtosis Estandarizada	-0.289715

Tab.6. Principales estadísticos de la serie de datos del estudio de las prevalencias de parasitación realizado en la finca de muestreo n°2.

Del análisis estadístico de la prevalencia de parasitaciones en cada finca de muestreo resulta que, puesto que son datos que se puede asumir provienen de una distribución normal, se puede establecer con el 95% de confianza, que el porcentaje de parasitación medio esta sujeto a unos intervalos de confianza así como unos intervalos de confianza entre los que se encontrará la desviación estándar, todo ello con una probabilidad del 95 %.

Prevalencia de parasitación de dípteros endoparásitos (%)	Promedio	Intervalos de confianza para el promedio al 95%	Desviación estándar	Intervalos de confianza para la desviación estándar al 95%
Finca nº 0	23,63	[14.5332; 32.7256]	23,59	[10.1417; 24.3075]
Finca nº 1	17.6974	[11.1456; 24.2493]	10.3118	[7.30486; 17.5083]
Finca nº 2	21.757	[16.0234; 27.4906]	9.02406	[6.3926; 15.3218]

Tab.7. Principales estadísticos de la serie de datos del estudio de las prevalencias de parasitación.

Se ajusta una cifra para la prevalencia de las parasitaciones verdaderas, teniendo en cuenta ahora el análisis de estadístico de los resultados estudiados en los carpóforos que, tras clasificarse en campo como no parasitados, los aislamientos y cuarentenas resultaron que sí eran ejemplares parasitados. Puesto que el estudio arroja la media de que el 2.60% de las veces que en campo no se detectan larvas en el interior de los carpóforos, con unos intervalos de confianza de +/- 2.03597, al 95% de probabilidad, se pueden mayorar los datos de prevalencia en campo con este dato de laboratorio, resultando las siguientes aproximaciones (Tab.8).

Prevalencia de parasitación de dípteros endoparásitos (%).	Promedio
Finca nº 0	26,23
Finca nº 1	20,29
Finca nº 2	24,36
Prevalencia media:	23,62%

Tab.8. Prevalencia de parasitación de dípteros endoparásitos en las producciones de Pleurotus eryngii estudiadas.

Estimando una cifra de depreciación de las recolecciones, cuantificando los daños producidos por dípteros parásitos, se hace la siguiente aproximación:

Peso del carpóforo de *P.eryngii* tipo, óptimo para la recolección: 23 gr

Precio máximo que alcanza comercializado en fresco: 28,9€/kg

Superficie de estudio: 2,68 ha

Cosecha media de: 1.172,6 carpóforos/ha y temporada

27 Kg carpóforos/ha y temporada

9 Kg carpóforos/ha y mes

Depreciación por parasitaciones:

Ejemplares parasitados totales: 239,16 carpóforos parasitados/ha y temporada

5,5 kg carpóforos parasitados/ha y temporada

Total depreciación económica del recurso: **160 €/ha y mes**

3.2 Dinámica de las poblaciones parásitas en relación con la dinámica de las poblaciones del hongo hospedante.

En cuanto a la dinámica que han mostrado las poblaciones parásitas y las poblaciones de *Pleurotus eryngii*, en los datos de campo de 2007 se reflejan las condiciones climatológicas que se dieron durante el estudio, registrándose para las muestras 2,3 y 4 (Fig.27), un periodo de sequía prolongado, resultando una caída de la producción pero no una desaparición de parasitaciones, las cuales reflejan en sus porcentajes un patrón que parece ser independiente de este fenómeno y que se analizará más adelante.

Para estimar la relación que puede guardar la pluviometría con la producción de hongo, se muestran a continuación los datos climatológicos registrados en el periodo de estudio en la estación meteorológica próxima a la zona de trabajo, término municipal de Riaza (Segovia), comparándolos con los muestreos realizados:

Registro pluviométrico diario de la estación meteorológica de Riaza (Segovia) en mm, 2007:

OCTUBRE: **42;133;86;147**;0;0;0;0;0;2;0;0;0;0;0;**4;3**;0;0;0;0;0;**215**;3;0;0;0;**0**;0;-3;0
 NOVIEMBRE : 0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0;**76;108;0;47**;0;0;0;0;0;0;0;
 DICIEMBRE: 30;0;0;0;12;0;0;18;0;0;0;0;0;0;0;0;3;0;37;0;0;0;0;0;0;0;0;0;0

1,2,3 y 4 de octubre: Lluvias tempranas que no activan la fructificación del hongo.

16 y 17 de octubre: Las lluvias que marcan el inicio de la temporada (Muestra N° 0 de la Tab.1) resultan demasiado escasas y hacen que la primera recolección ó “florada” no sea tan abundante cómo debiera.

Las lluvias registradas el **23 de octubre** generan una gran recolección (Muestra N° 1 de la Tab.1) y a partir de ahí comienza una sequía prolongada hasta el **19 de noviembre** (que pertenece a la Muestra N° 5 de la Tab.1). Las lluvias posteriores recuperan la producción pero las bajas temperaturas acabarían, tres semanas más tarde, con la temporada de setas (Muestra N° 7 del 9 de diciembre).

Registro de temperaturas diarias máximas y mínimas de la estación meteorológica de Riaza (Segovia) en °C , 2007:

OCTUBRE: T^a máx:

20.0;21.0;16.0;18.0;16.5;21.5;21.5;19.5;20.0;19.0;19.0;20.5;21.0;22.5;19.5;21.5;
 19.0;20.5;20.5;21.0;21.0;18.5;12.5;11.0;10.5;8.0;15.0;17.0;14.0;10.0;12.5;12.5

OCTUBRE: T^a min:

11.5;12.0;9.0;8.0;9.0;9.0;9.5;5.5;4.5;6.5;6.5;6.5;7.0;8.5;7.0;8.0;7.5;6.0;5.5;3.0;3.
 5;5.5;5.5;5;**0;0;0**;3.0;1.5;1.0

NOVIEMBRE: T^a máx:

17.0;19.5;19.5;19.0;17.0;19.0;19.5;17.5;16.5;19.5;19.5;17.5;13.0;7.0;6.5;9.5;12.
 5;13.0;12.5;11.0;10.0;9.0;5.0;7.5;8.0;8.0;9.5;9.0;3.5;11.5;

NOVIEMBRE :T^a min:

-2.0;-2.0;2.5;4.0;5.0;2.0;1.5;1.5;4.0;5;5;3.0;3.0;0;-1.0;-6.0;-6.0;

3.0;0;4.5;4.0;2.5;5;-2.5;-4.5;-4.5;-1.0;-1.5;-2.5;-3.0

DICIEMBRE: Tª máx:

9.0;5.0;7.5;13.5;12.0;9.0;7.0;10.0;**9.5**;4.5;6.0;10.5;10.0;11.0;9.0;6.0;3.0;4.0;6.5;

4.0;6.0;8.5;11.5;7.5;8.5;8.0;11.0;9.0;8.5;9.0;8.5

DICIEMBRE: Tª min:

-2.0;0;-5;3.5;3.5;3.0;1.5;5;4.5;1.0;-2.0;-4.0;-4.0;-5.0;-5.0;-4.5;-5.0;-4.5;-

1.5;2.5;3.0;4.0;2.0;-5;-2.0;-1.0;-2.0;-3.0;-2.0;-5;-2.0

El **9 de diciembre** (Muestra N° 7 de la Fig.27) se dio por terminada la temporada de setas.

Las gráficas que muestran la recolección semanal, detallada para cada una de las fincas de estudio, son las siguientes (Fig. 30-32):

Fig.30. Conteo semanal de carpóforos sin parasitar y parasitados en la Finca 0 durante la temporada 2006 (A-D) y la temporada 2007 (muestras 0-7).

Fig.31. Conteo semanal de carpóforos sin parasitar y parasitados en la Finca 1 durante la temporada 2006 (A-D) y la temporada 2007 (muestras 0-7).

Fig.32. Conteo semanal de carpóforos sin parasitar y parasitados en la Finca 2 durante la temporada 2006 (A-D) y la temporada 2007 (muestras 0-7).

En la figura nº 30. Se observa para la temporada 2007 del “Finca 0” una menor producción del hongo, donde, como refleja el gráfico, sigue manteniéndose un índice de parasitación similar a las otras fincas de muestreo. En la Finca 1, figura nº 31, a diferencias con las otras fincas, la recolección abundante de inicio de temporada 2007 se produce una semana más tarde (Muestra Nº1). Tras ella, desciende la producción por la falta de precipitaciones e, igualmente, se mantiene el porcentaje de parasitaciones.

La “Finca 2”, es la primera de las tres en iniciar la temporada, con una recolección inicial abundante en la Muestra Nº 0 del 19 de octubre (Fig.32). La producción es muy similar a la de su vecina “Finca 1”. La sequía registrada entre el 28 de octubre y el 23 de noviembre del 2007 ha afectado a la producción en mayor medida que a las otras fincas, registrándose mínimos en las Muestras Nº 2, 3 y 4. Tiene esto relación con el hecho de que la humedad edáfica en ésta finca es menor que en las otras, lo que hace que tenga menos capacidad para amortiguar dicha sequía.

Los resultados muestran que la finca más productiva ha sido la “Finca 1”, con producción muy similar a la de la “Finca 2”, mientras que la más parasitada ha sido ésta última.

Los gráficos anteriores mostraron la afección de la floración del hongo con la falta de precipitaciones. La figura nº 33 refleja la relación que guarda la falta de agua con los porcentajes de parasitación. Se aprecia la caída de la producción en las semanas de las muestras 2, 3 y 4. La producción se recupera en la muestra Nº 5 con 536 carpóforos recolectados. En estas semanas, las poblaciones de dípteros endoparásitos consiguen mantener sus niveles de parasitación, no siendo mayores ni menores a su dinámica habitual:

		Carpoforos totales recolectados	Carpóforos parasitados	Datos pluviométricos asociados.
19-oct.	MUESTRA N°0	428	9,7%	4mm
28-oct.	MUESTRA N°1	523	23,71%	0mm
4-nov	MUESTRA N°2	149	10,42%	0mm
11-nov	MUESTRA N°3	122	39,55%	0mm
18-nov	MUESTRA N°4	107	33,65%	0mm
25-nov	MUESTRA N°5	536	28,7%	76/108/47mm
2-dic	MUESTRA N°6	611	25.99%	30mm
9-dic	MUESTRA N°7	220	21,78%	12/18 mm

Fig.33. Relación entre la producción de hongo y los porcentajes de parasitación durante la sequía registrada en la temporada 2007.

Si consideramos los ejemplares de carpóforos que resultaron estar parasitados independientemente del grado de daños producido, tenemos la evolución de las parasitaciones de dípteros en las fincas de estudio (Fig.34-36). Cada punto representa una semana de recolección y el porcentaje de carpóforos afectados en esa recolección. Estas gráficas representan, por tanto, las curvas poblacionales de los dípteros endoparásitos presentes en las praderas.

Finca 0.

Gráfico Secuencias Cronológicas

Fig.34. Dinámica de las poblaciones de dípteros endoparásitos registrada en la Finca 0 durante la temporada 2006 y la temporada 2007.

Finca 1.

Gráfico Secuencias Cronológicas

Fig.35. Dinámica de las poblaciones de dípteros endoparásitos registrada en la Finca 1 durante la temporada 2006 y la temporada 2007.

Finca 2.

Gráfico Secuencias Cronológicas

Fig.36. Dinámica de las poblaciones de dípteros endoparásitos registrada en la Finca 2 durante la temporada 2006 y la temporada 2007.

Los muestreos llevados a cabo durante la temporada del 2006 no fueron en semanas consecutivas con lo que la dinámica poblacional de los dípteros endoparásitos presentes en la pradera no puede correlacionarse cronológicamente con la gráfica expuesta. Sin embargo, si puede deducirse en

el trazo correspondiente al 2007 una dinámica poblacional en forma de “diente de sierra”, correspondiente a las diferentes generaciones de dípteros que se van sucediendo a lo largo de la temporada, las cuales, aunque coexisten y se solapan a medida que avanza la temporada de *Pleurotus eryngii*, atienden a ciertos patrones que se reflejan en los porcentajes de parasitación como descensos bruscos de las mismas o importantes grados de infestación.

Se analiza ahora si existe algún tipo de relación entre las variaciones en la producción de carpóforos en las praderas y la dinámica poblacional del parásito. Se representan para cada finca dos gráficos: el primero de ellos representa el número de carpóforos recolectados o lo que es lo mismo la producción semanal en la finca (trazo azul) y, de ella, el número de carpóforos que resultaron parasitados (trazo rojo) que se recogieron. En el gráfico contiguo se han transformado las series de datos anteriores de forma que representan el peso que han supuesto las variables con respecto al total de la temporada en esa finca. Se aprecia cómo, al caer la producción de setas, las parasitaciones mantienen un peso considerable a mitad de temporada (Fig.37-39).

Fig.37. (Arriba): Gráfico comparativo de la producción de *Pleurotus eryngii* en las fincas de muestreo y las parasitaciones encontradas en dicha producción en la finca 0. (Abajo): Gráfico que muestra el peso de ambas variables con respecto al total de la cosecha de la temporada y al total de las parasitaciones de la temporada. Las muestras 1, 2, 3 y 4 corresponden a las cosechas recogidas durante la temporada 2006; las muestras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 corresponden a las cosechas semanales durante la temporada 2007.

*Fig.38. (Arriba): Gráfico comparativo de la producción de *Pleurotus eryngii* en las fincas de muestreo y las parasitaciones encontradas en dicha producción en la finca 1. (Abajo): Gráfico que muestra el peso de ambas variables con respecto al total de la cosecha de la temporada y al total de las parasitaciones de la temporada. Las muestras 1, 2, 3 y 4 corresponden a las cosechas recogidas durante la temporada 2006; las muestras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 corresponden a las cosechas semanales durante la temporada 2007.*

Fig.39. (Arriba): Gráfico comparativo de la producción de *Pleurotus eryngii* en las fincas de muestreo y las parasitaciones encontradas en dicha producción en la finca 2. (Abajo): Gráfico que muestra el peso de ambas variables con respecto al total de la cosecha de la temporada y al total de las parasitaciones de la temporada. Las muestras 1, 2, 3 y 4 corresponden a las cosechas recogidas durante la temporada 2006; las muestras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 corresponden a las cosechas semanales durante la temporada 2007.

Las muestras 1,2,3 y 4 corresponden a las cosechas recogidas durante la temporada 2006; las muestras 6 a 13 corresponden a las cosechas recogidas en el 2007. Se puede observar que la producción de la temporada de seta de cardo del 2006 fué óptima (gráfica en forma de Campana de Gauss) muy diferente a la temporada 2007 que presenta una curva de producción completamente anómala a una producción normal, causa de la sequía prolongada que se registró a mitad de la temporada y que queda reflejada en los muestreos número 8, 9 y 10, dónde la producción se desploma. Este descenso en la producción no es acompañado por la desaparición de las parasitaciones, cuyos porcentajes se mantienen elevados. Tampoco se aprecia una relación entre los picos que marcan abundancia de carpóforos en la pradera y los porcentajes de parasitación, pudiendo reflejarse una dinámica poblacional independiente entre parásito y hongo. Sí parece coincidir la tendencia de ambas poblaciones con las oscilaciones térmicas que marcan los principios y fines de temporada.

Para apreciaciones más sutiles se lleva a cabo una serie de analisis estadísticos que relacionen ambas series de datos. Estudiando la naturaleza de los datos muestrales se concluye que las recolecciones de carpóforos en las praderas no pueden asemejarse a datos muestrales provenientes de una distribución normal por lo que, para comparar estadísticamente esta serie con la serie de porcentajes de parasitaciones se realiza un análisis de varianza, comprobando, al finalizar este análisis, la normalidad de sus residuos que valide dicho análisis.

Se transforma la variable del porcentaje de carpóforos recolectados en rangos de la forma que muestra la tabla:

	recolectados %	recolección rangos		recolectados %	recolección rangos
Muestra A	11.05722599	10-20%	Muestra 0	11.02564103	10-20%
	22.43150685	20-40%		6.805444355	0-10%
	32.64840183	20-40%		28.38221381	20-40%
Muestra B	27.64306499	20-40%	Muestra 1	6.923076923	0-10%
	36.55821918	20-40%		6.805444355	0-10%
	23.74429224	20-40%		13.52885525	10-20%
Muestra C	51.30940834	40-60% punto extremo	Muestra2	3.58974359	0-10%
	32.79109589	20-40%		6.805444355	0-10%
	37.67123288	20-40%		2.270577105	0-10%
Muestra D	9.990300679	0-10%	Muestra 3	7.179487179	0-10%
	8.219178082	0-10%		3.122497998	0-10%
	5.936073059	0-10%		5.203405866	0-10%
Muestra 4	7.692307692	0-10%	Muestra 6	21.79487179	20-40%
	4.323458767	0-10%		31.94555645	20-40%
	2.175969726	0-10%		12.01513718	10-20%
Muestra 5	20	10-20%	Muestra 7	21.79487179	20-40%
	11.52922338	10-20%		5.124099279	0-10%
	29.70671712	20-40%		6.717123936	0-10%

Tab.9. Tranformación de serie de datos porcentaje de recolecciones semanales de carpóforos de *P.eryngii* en rangos.

Se detecta un punto extremo en la Muestra C. Tras comprobar que existe una interferencia mayor de 3 a 1 entre las desviaciones estándar mayor y menor; puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles es similar y viendo la diferencia entre estas sigmas a través de una preba de Verificación de Varianza, se decide excluir este dato del análisis.

Como apreciación general se analiza la influencia de la cuantía de las recolecciones de seta de cardo en cada muestreo, como variable cualitativa en la cantidad de parasitaciones (Fig.40 y Tab.10):

Fig.40. Gráfico Fisher LSD para las recolecciones por rangos.

Tabla ANOVA para % parasitados en campo sin extremo por recolección rangos sin extremo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	28.4631	2	14.2315	0.10	0.9092
Intra grupos	4769.37	32	149.043		
Total (Corr.)	4797.83	34			

Tab.10. Tabla ANOVA para % carpóforos parasitados en campo recolección rangos.

Análisis de ANOVA Simple para el porcentaje de carpóforos parasitados en campo por rangos de recolección:

- Variable dependiente: % carpóforos parasitados en campo.
- Factor: recolección rangos (con respecto al total de carpóforos recogidos en la temporada otoñal)
- Número de observaciones: 35
- Número de niveles: 3 (se excluye el rango correspondiente al 40-60% por tratarse de un punto extremo no representativo del análisis del conjunto)

El análisis de varianza refleja que la parasitación media es independiente de la cuantía de recolecciones.

Se realiza la Prueba de Múltiple Rangos para los porcentajes de carpóforos parasitados en campo (Tab.11). Se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0-10%	17	20.1935	x
20-40%	12	20.5268	x
10-20%	6	22.6911	x

Tab.11.Prueba de Múltiple Rangos para los porcentajes de carpóforos parasitados en campo.

Verificación de Varianza				
	Prueba	Valor-P		
Levene's	4.12051	0.0255679		

Comparación	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Valor
0-10% / 10-20%	15.0168	11.8424	1.60797	0.6294
0-10% / 20-40%	15.0168	6.46718	5.39172	0.0073
10-20% / 20-40%	11.8424	6.46718	3.35312	0.0879

Tab.12.Prueba de Verificación de la Varianza.

La Verificación de la Varianza muestra que, puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes. Tab.12. La tabla también muestra una comparación de las desviaciones típicas para cada par de muestras. P-valores por debajo de 0.05, de los cuales hay uno, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las dos sigmas al 5% de nivel de significación.

Analizando la normalidad de los residuos resultantes, los estadísticos reflejan que proceden de una distribución normal, además se ha comprobado que son independientes, con medias próximas a cero y variabilidad constante. Los análisis que se muestran a continuación reflejan este aspecto. Este hecho valida la aplicación del análisis de varianza anterior. De este análisis de la varianza se puede concluir que la dinámica poblacional del parásito en las praderas productoras no atiende a las fluctuaciones que puedan darse en las recolecciones. No obstante y, según la metodología descrita, se debe comprobar la normalidad de los residuos que corrobore tal afirmación del análisis anterior:

Análisis de normalidad de los residuos ANOVA: Datos/Variable: RESIDUOS Anova sin extremo (Residuos). 35 valores con rango desde -17.8406 a 26.2351 (Tab.13 y Fig.41).

Recuento	35
Promedio	-0.00000685714
Desviación Estándar	11.8438
Coefficiente de Variación	-1.72722E8%
Mínimo	-17.8406
Máximo	26.2351
Rango	44.0757
Sesgo Estandarizado	0.66665
Curtosis Estandarizada	-0.973924

Tab.13. Comprobación de la normalidad de los residuos. Principales estadísticos.

Fig.41.Prueba de Normalidad de los residuos ANOVA.

Ajuste de Datos No Censurados de la variable residuos ANOVA sin extremo Datos/Variable: 35 valores con rango desde -17.8406 a 26.2351:

Distribuciones Ajustadas	
Normal	
media =	-0.00000685714
desviación estándar =	11.8438

Tab.14. Ajuste de datos no censurados de los residuos ANOVA.

La prueba de Shapiro-Wilk está basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.956999	0.237244

Tab.15.Prueba de Shapiro-Wilk de los residuos ANOVA.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0.05, no se puede rechazar la idea de que RESIDUOS Anova sin extremo proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Pruebas de Bondad-de-Ajuste para RESIDUOS Anova sin extremo.
Prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tab.16):

	<i>Normal</i>
DMAS	0.0910443
DMENOS	0.0663771
DN	0.0910443
Valor-P	0.933778

Tab.16.Prueba de Bondad de Ajuste y de Kolmogorov-Smirnov de los residuos ANOVA.

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es mayor ó igual a 0.05, no se puede rechazar la idea de que residuos Anova sin extremo proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

Por último se comprueba la independencia de estos residuos (Fig. 42 y 43 y Tab.17):

Gráfica de Serie de Tiempo para RESIDUOS anova sin extremo_1

Fig.42.Serie de tiempos de los residuos ANOVA.

Autocorrelaciones Estimadas para RESIDUOS Anova sin extremo_1

			<i>Límite en 95.0%</i>	<i>Límite en 95.0%</i>
<i>Retraso</i>	<i>Autocorrelación</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
1	0.464823	0.169031	-0.331295	0.331295
2	0.334205	0.202281	-0.396465	0.396465
3	0.378704	0.217486	-0.426266	0.426266
4	0.176692	0.235575	-0.461719	0.461719
5	0.0656824	0.239331	-0.469081	0.469081
6	0.275152	0.239846	-0.47009	0.47009
7	0.229541	0.248701	-0.487446	0.487446
8	0.00483503	0.254682	-0.499169	0.499169
9	0.190193	0.254685	-0.499174	0.499174
10	-0.0201575	0.258711	-0.507065	0.507065
11	-0.200864	0.258756	-0.507153	0.507153

Tab.17. Autocorrelación de los residuos ANOVA.

Fig.43. de auto correlación de los residuos ANOVA.

En este caso, uno de los 24 coeficientes de autocorrelación parcial es estadísticamente significativo con un 95.0% de nivel de confianza. Se concluye una leve dependencia entre los residuos que puede llegar a interpretarse como dependencia temporal entre muestreo y muestreo. Además, el estadístico de Kruskal-Wallis corrobora los resultados del análisis de varianza. Este estadístico es indicado para series de datos que no reflejan una distribución normal.

recolección rangos sin extremo	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0-10%	17	17.2941
10-20%	6	19.75
20-40%	12	18.125

Estadístico = 0.25753 Valor-P = 0.87918

Tab.18. Prueba de Kruskal-Wallis de los residuos ANOVA.

Por tanto resulta que la dinámica poblacional del parásito en las praderas productoras no atiende a las fluctuaciones que puedan darse en la fructificación del hongo.

3.3 Producción de *Pleurotus eryngii* en la zona de estudio.

Las recolecciones en 2006 fueron un total de cuatro, realizándose dos de ellas en el mes de octubre (12 oct., 27 oct., 25 nov. y 8 dic.). Las de 2007 suman un total de ocho semanas (del 19 oct. al 9 dic.) produciéndose el máximo de recolección en el mes de noviembre.

La intensidad del aprovechamiento en la temporada 2007 supone que el rendimiento de las recolecciones se acerque al pleno rendimiento. Para el cálculo de la producción media consideramos que un carpóforo adulto tipo posee un peso de 23 gramos (ejemplar tipo definido en la página 65). De ésta manera, se estima que la producción media en las tres fincas de estudio ha sido de 9 kg setas de cardo por hectárea y mes.

3.4 Ensayo de control de dípteros mediante atrayentes.

El porcentaje de capturas del Orden Diptera en el estudio es del 45,78%. Las capturas más abundantes del resto de los Ordenes han sido para Hymenoptera (30%). El listado total de capturas en las trampas de captura se muestra en la tabla nº 9:

			Nº ejemplares
CLASE INSECTA.	O. DIPTERA	Nematóceros (Fam. <i>Mycetophilidae</i>)	6■
		Mosca común (Gén. <i>Musca</i>)	24
		Otros dípteros	8
	O. HYMENOPTERA	Hormigas (Fam. <i>Formicidae</i>)	23
		Abejas (Fam. <i>Apidae</i>)	2
	O. THYSANOPTERA	Trips	2
	O. COLEOPTERA	Escarabajos (Fam. <i>Coccinellidae</i>)	5
	O. COLLEMBOLLA	Colémbolo (Subord. Symphypleona)	8■
CLASE GASTROPODA	O. SIGMURETHRA	Babosas (Fam. <i>Arionidae</i>)	4■
CLASE ARACHNIDA	O. ARANEAE	Arácnidos	1

- Especies asociadas a daños en la seta de cardo (*Pleurotus eryngii*). (Amaringo-Cortegano, 2013; Rollán, 1989; Tobar, V. *et al*, 2008).

Tab.19. Registro de las capturas en las trampas de captura.

Respecto a los dípteros nematóceros parásitos de *Pleurotus eryngii*, similares a los obtenidos a partir de la evolución de las larvas parásitas en laboratorio, se han colectado un total de 6 ejemplares (en las tres fincas en toda la temporada) cantidad que no representa la abundancia de las poblaciones de parásitos en el campo que se detectan en los estudios que cuantifican la importancia de las parasitaciones. Se considera, por tanto, insuficiente el poder atrayente del cebo hacia los *Mycetophilidae*, no cumpliendo por ello los objetivos, como controladores de éstas poblaciones, para los que fueron colocadas las trampas de captura.

No hay influencia entre las parasitaciones de las praderas con trampas de captura, comparándose con el porcentaje de setas agusanadas anterior a la colocación de las trampas. Se deduce por tanto la ineficacia del atrayente utilizado en las trampas de captura para dípteros parásitos asociados a *P.eryngii* en el campo.

Por otra parte, sí aparece cierta relación entre los carpóforos afectados por parásitos en la parcela dónde se colocaron las trampas y las parasitaciones del resto de la superficie de estudio (sin presencia de trampas). La relación entre los datos de porcentajes de ambas superficies, con y sin presencia de trampas, corrobora la ineficacia de estas trampas de captura a la hora de reducir las parasitaciones (Fig.42).

Por tanto, las trampas de captura con atrayente de proteínas hidrolizadas (Smellfol) no mejora la calidad de las recolecciones del hongo. Este estudio se considera un primer intento de control biológico de los dípteros parásitos de *P.eryngii* en su hábitat natural. Más adelante, cuando se llega a conocer el momento exacto en que el insecto parasita los carpóforos, que coincide con un estado evolutivo muy concreto del carpóforo, se inicia la búsqueda de aromas atrayentes específicos para éstos dípteros parásitos utilizando técnicas instrumentales de microextracción de aromas que se presentan en esta

memoria y sobre las que se continúa trabajando como línea de investigación actual.

COMPARACIÓN PARASITACIONES EN PARCELA CON TRAMPAS Y PARASITACIONES EN EL RESTO DE LA SUPERFICIE."Finca 0"

COMPARACIÓN PARASITACIONES EN PARCELA CON TRAMPAS Y PARASITACIONES EN EL RESTO DE LA SUPERFICIE."Finca 1"

Fig.42a y 42b. Gráficos que comparan las prevalencias de parasitación en las parcelas con trampas de captura y en el resto de la superficie de las fincas de muestreo, sin presencia de trampas.

COMPARACIÓN PARASITACIONES EN PARCELA CON TRAMPAS Y
PARASITACIONES EN EL RESTO DE LA SUPERFICIE."Finca 2"

Fig.42c. Gráficos que comparan las prevalencias de parasitación en las parcelas con trampas de captura y en el resto de la superficie de las fincas de muestreo, sin presencia de trampas.

3.5 Presencia de parásitos en comercializadas. Estudio de mercado.

Se analizan los datos proporcionados por el muestreo aleatorio de setas silvestres comercializadas en fresco adquiridas en un comercio especializado. Se deducen índices de abundancia de parásitos, condiciones de presentación al público del producto y una aproximación directamente económica de la depreciación que suponen en el producto.

Se realiza un primer muestreo en el comercio que servirá para calcular el tamaño de muestra mínimo para valorar el porcentaje de parasitaciones representativo del total de la oferta. Tab. 20.

Cálculo del tamaño de muestra mínimo (n') dónde $\hat{p}$ estimador será la prevalencia de parasitaciones obtenidas en campo (Tab.8):

$$n \geq n_0 = (Z_{0,975} / d_0)^2 * \hat{p} (1-\hat{p}) = (1,96 / 0,05)^2 * 0,23 (1- 0,23) = 272,14$$

$$\text{Si } n_0 / N > 0,05 \rightarrow n \geq n' = n_0 / (1+n_0/N)$$

$$272,14 / 915 = 0,29 > 0,05 \rightarrow n \geq n' = 272,14 / (1+ 0,29) = \mathbf{210}$$

Por tanto, para estimar el porcentaje de setas que vamos a comprar parasitadas en este comercio especializado, con un nivel de confianza del 95% y un error de estimación no superior al 0,05, se deben elegir al menos 210 muestras. La compra desechada se calculará como el número de ejemplares que, debido al grado de agusanamiento presentado, se considera desagradable su ingesta, total y parcialmente, definido tal y como se explica en la metodología. Se fijó el grado de agusanamiento G_3 , carpóforo “algo agusanado” como “umbral de ascos” para el consumo.

Las larvas encontradas en el interior de los carpóforos parasitados muestran, en la mayoría de los casos, grados evolutivos avanzados y graves daños en los tejidos internos de su hospedante (Fig.43). Por ello casi la totalidad las muestras parasitadas es el porcentaje de depreciación de las recolecciones. Estas larvas encontradas en el interior de las muestras se someten a la cría para tratar de obtener los imagos de estos parásitos. La última columna de la tabla nº 21 muestra los imagos resultantes de esta cría y, si estos imagos se asemejan a las especies que están resultando asociadas a *Pleurotus eryngii* en campo, se someten a identificación taxonómica. Todos los imagos resultantes fueron dípteros nematóceros salvo en el caso del *Lactarius deliciosus* donde una de sus muestras resultó estar parasitada por un coleóptero.

El estudio de mercado realizado concluye que de 295 carpóforos comprados en éste comercio especializado en productos silvestres frescos, 111 se encuentran, en mayor ó menor medida, parasitada (el 40,3% de la compra)

y, considerando desechables los ejemplares con un grado de agusanamiento de Ga₃ o mayor según la clasificación definida (apartado 2.1 del Capítulo 2), el 34% de la compra no se consumiría. La compra se ha depreciado en prácticamente todas las ocasiones y en porcentajes muy variados, que van, en uno de los casos, a la totalidad de la misma. Resultan un total de 238€ invertidos y 113€ de este presupuesto, desechados (Tab.21 y 22).

En cualquier caso, los carpóforos que se adquirieron mostraban un aspecto exterior saludable y óptimo, sin síntomas externos de parasitaciones. Ésta es una particularidad que tienen los dípteros micófagos: sus puestas no generan ningún tipo de sintomatología externa que haga pensar en la presencia de larvas en el interior. En la figura nº 43 se aprecia perfectamente la buena presencia externa del carpóforo en el punto de venta, encontrándose el interior dañado.

Fig.43. Higrophorus marzuolus (arriba) y Lepista candida (abajo). Se aprecia cómo las cutículas del sombrero están inalteradas y cómo, al seccionarlo, aparecen grandes galerías que perforan los tejidos internos.

Si la sección producida en el pie para su recolección ya se encontrase perforada por galerías, ese ejemplar se podría desechar en campo. De no ocurrir esto, la sección es limpia y, ó no existe puesta, ó se encuentra en el interior del sombrero y llegan las larvas, ocultas, hasta los comercios. Por tanto es difícil detectar las larvas a no ser que se seccionen longitudinalmente los carpóforos.

Todos éstos resultados obtenidos están relacionados directamente con el lugar y momento de colocación de las puestas de muchos parásitos micófagos en el cuerpo del carpóforo; también con el comportamiento de las larvas durante su desarrollo en el interior.

La puesta se ha de producir en algún punto de cutículas blandas, probablemente en el pie ó bajo las láminas del sombrero, depositandolas en los tejidos internos, y en estadios jóvenes del carpóforo, pues, las larvas, no rompen ni dañan cutículas externas maduras. Pese a la voracidad que presentan las larvas, ingieren el interior del pie y sombrero sin alterar las cutículas externas.

Las larvas encontradas en el interior de los carpóforos parasitados, muestran actividad normal, no encontrando larvas muertas y sin detener su ingesta. Estas larvas evolucionan adecuadamente en el carpóforo recolectado hasta su madurez, e incluso, llegado el momento, lo abandonan para pupar con el mismo proceder que se observa en el estudio de la cría de larvas realizado. Significa esto que la evolución de las larvas en los tejidos internos de los carpóforos no se paraliza por la extracción del micelio ni por los tratamientos de conservación a los que son sometidos para su comercialización.

Teniendo en cuenta que el grado de infestación crece con los días y que su evolución no se ve alterada por la extracción del carpóforo del campo ni por la aplicación de frío artificial¹⁷, se puede tener la mala suerte de llevar a casa el peso de la compra en larvas. Pero no hay mucho que se pueda hacer, el

¹⁷ Conclusión también resultante del estudio realizado referente a la respuesta de las larvas al frío artificial, apartado 3.6 de este capítulo 3.

consumidor puede optar por especies con tejidos internos más tersos como *Amanita caesarea* ó *Cantarellus* spp., que parecen ser menos afectados por los parásitos polífagos, especies que recoge en su trabajo Hackman y Meinander, (Hackman y Meinander, 1979) ó coleccionar especies relativamente más jóvenes (Hiukko, 1978).

Se ha llegado a completar la evolución de las larvas procedentes de estos carpóforos adquiridos en comercio en varias de las muestras. Para ejemplares de *P.eryngii*, la identificación del parásito en todos los casos resultó ser *Tarnania fenestralis*¹⁸ que también se ha identificado en *Boletus* spp.. *Rymosia pseudocretensis* se ha identificado en el champiñón silvestre (Tab.20 y 21).

¹⁸ Resultados de la identificación taxonómica realizada en el apartado 3.11 de este capítulo 3.

ESPECIE Y PROCEDENCIA	Nº EJEMPLARES MUESTREADOS	Nº EJEMPLARES AGUSANADOS y Ga	Nº EJEMPLARES TOTALES ESTIMADOS DE LA MUESTRA (CAJAS DE 5 KG)	ASPECTO EXTERNO.	PRECIO	COMPRA DESECHADA	IMAGOS OBTENIDOS TRAS LA CRÍA DE LARVAS
<i>Boletus edulis</i> ("Boleto")- Zamora	10	10 Ga4	38	óptimo	32 € (a 24€ /kg)	32 € 100%	15 Dípteros nematódicos no identificados y 2 <i>T.fenestralis</i>
<i>Lepista candidus</i> ("Lepista blanca")- Huesca	20	3Ga2 y 12 Ga4	200	óptimo	8 € (a 16€ /kg)	6,0 € 75%	8 dípteros nematódicos no identificados
<i>Lepista panaeolus</i> ("Lepista parda")- Huesca	10	8 Ga4	100	óptimo	12€ (a 24€ /kg)	9,6 € 80%	0
<i>Higrophorus marzuolus</i> ("Marzuelo")- La Rioja	10	6 Ga4	75	óptimo	8 € (a 12€ /kg)	4 € 40%	8 Dípteros nematódicos no identificados
<i>Pleurotus eryngii</i> ("Seta de cardo")- Soria	10	5 Ga2 y Ga3	167	óptimo	6 € (a 40€ /kg)	2 € 25%	30 todos ellos <i>T.fenestralis</i>
<i>Lactarius deliciosus</i> ("Níscalo")- Soria	10	2 Ga3	151	Coloraciones verdes y púrpuras.	6 € (a 18€ /kg)	1,2 € 20%	3 coleópteros
<i>Cantharellus cibarius</i> ("Rebozuelo")-León	5	1 Ga3	169	óptimo	4 € (a 27€ /kg)	0,8€ 20%	0
<i>Amanita caesarea</i> ("Amanita de los Césares")- Huesca	5	0	15	óptimo	6 € (a 6€ /Unid.)	0 € 0%	-
	TOTAL SETAS MUESTREADAS n*: 80		TOTAL SETAS ESTIMADAS N*: 915				

Tab.20. Resultados de los muestreos de carpóforos de hongos silvestres adquiridos en comercio especializado. Primer muestreo que servirá para calcular el tamaño mínimo de muestra que definirá el segundo muestreo. n*= número de muestras del muestreo inicial y N*= oferta total de carpóforos estimada en el comercio.

ESPECIE Y PROCEDENCIA	Nº EJEMPLARES MUESTREADOS	Nº EJEMPLARES AGUSANADOS y Ga	ASPECTO EXTERNO DE LAS SETAS.	PRECIO	COMPRA DESECHADA	IMAGOS OBTENIDOS TRAS LA CRÍA DE LARVAS
<i>Boletus edulis</i> ("Boleto")- Soria	10	8 Ga4	óptimo	32 € (a 24€ /kg)	25,6 € 80%	28 Dípteros nematódicos Fam. <i>Sciaridae</i>
<i>Lepista candidus</i> ("Lepista blanca")- Huesca	30	17 Ga4	óptimo	8 € (a 12 € /kg)	4,8 € 56%	0
<i>Lepista panaeus</i> ("Lepista parda")- Huesca	30	9 Ga4	óptimo	28 € (a 24€ /kg)	8,4 € 30%	3 Dípteros nematódicos no identificados
<i>Agaricus campestris</i> ("Champiñón silvestre")-Valladolid	30	9 Ga3 y Ga4	óptimo	19 € (a 12€ /kg)	5,7 € 30%	8 Dípteros nematódicos no identificados y 7 <i>R.pseudocretensis</i>
<i>Pleurotus eryngii</i> ("Seta de cardo")- Soria	30	12 Ga4	óptimo	10,3€ (a 15€ /kg)	4,12 € 40%	7 <i>T.fenestralis</i>
<i>Lactarius deliciosus</i> ("Níscalo")- Soria	30	2 Ga2 y 5 Ga3	Coloraciones verdes y púrpuras.	15,7 € (a 18€ /kg)	3,6 € 23%	0
<i>Cantharellus cibarius</i> ("Rebozuelo")-León	30	5 Ga3	óptimo	27 € (a 27€ /kg)	4,4€ 16%	0
<i>Russula vesca</i> ("Rusula")- Soria	25	5 Ga4	óptimo	16 € (a 14€ /Unid.)	3,2 € 20%	3 Dípteros nematódicos no identificados
	TOTAL SETAS MUESTREADAS n: 215					

Tab.21. Resultados de los muestreos de carpóforos de hongos silvestres adquiridos en comercio especializado. Segundo muestreo.

3.6. Respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial.

Diez bandejas de muestras, cada una con 5 ejemplares de carpóforos de *P.eryngii*, con presencia visible de larvas de similares tamaños, se someten al experimento de respuesta de la evolución de las larvas al frío artificial en dos repeticiones. La respuesta de las larvas a las diferentes temperaturas de la cámara frigorífica se refleja en las siguientes tablas 22 y 23:

Fecha de exposición al frío: Repetición 1: Del 2-Nov.-07 al 7-Nov.-07

Fecha	Tamaño de las larvas: (3 categorías de tamaños aproximados.)	T ^a (°C)	Exposición (h)	Efectos en la larva:	Efectos en el carpóforo:
2-11-07 Bandeja 1	Grandes	-2°C	24h	Salen al exterior. Pupan bajo los sombreros.	Inicio de congelación.
3-11-07 Bandeja 2	Medianas	0°C	24h	Permanecen en el interior.	Frescura óptima
4-11-07 Bandeja 3	Pequeñas	+2°C	24h	Permanecen en el interior.	Frescura óptima
5-11-07 Bandeja 4	Grandes	+4°C	24h	Salen al exterior. Pupan bajo los sombreros.	Frescura óptima
6-11-07 Bandeja 5	Medianas	+8°C	24h	Permanecen en el interior.	Frescura óptima

Tab.22. Respuesta de las larvas al frío artificial. Primera repetición.

Fecha de exposición al frío: Repetición 2: Del 18-Nov.-07 al 23-Nov.-07

Fecha	Tamaño de las larvas: (3 categorías de tamaños aproximados.)	T ^a (°C)	Exposición (h)	Efectos en la larva:	Efectos en el carpóforo:
18-11-07 Bandeja 1	Grandes	-2°C	24h	Salen al exterior. Pupan bajo los sombreros.	Inicio de congelación.
19-11-07 Bandeja 2	Grandes	0°C	24h	Salen al exterior. Pupan bajo los sombreros.	Frescura óptima
20-11-07 Bandeja 3	Medianas	+2°C	24h	Permanecen en el interior.	Frescura óptima
21-11-07 Bandeja 4	Grandes	+4°C	24h	Salen al exterior. Pupan bajo los sombreros.	Frescura óptima
22-11-07 Bandeja 5	Pequeñas	+8°C	24h	Permanecen en el interior.	Frescura óptima

Tab.23. Respuesta de las larvas al frío artificial. Segunda repetición.

Las larvas no han presentado una respuesta distinta a la evolución mostrada en la cría de larvas realizada, que se desarrolla en el *apartado 3.7* de este mismo capítulo. El frío artificial, en las temperaturas en las que se les ha proporcionado, no ha modificado su desarrollo de forma apreciable. Las larvas salen de los carpóforos a pupar e, indistintamente de qué temperatura, construyen el pupario.

La respuesta de las larvas ha estado acorde con el estadio en el que se encontraban en el momento del experimento. Las más evolucionadas han conseguido pupar de igual forma con temperaturas de +4°C que con temperaturas de -2°C. Las menos evolucionadas han permanecido las 24h en el interior de los carpóforos.

Posteriormente, las larvas han continuado su evolución, incluso llegando muchas de ellas a su estado adulto.

3.7. Cría de larvas para la obtención de adultos en laboratorio.

Para poder llegar al conocimiento entomológico preciso de los parásitos asociados a *Pleurotus eryngii* ha sido imprescindible el éxito de la evolución artificial de sus larvas en laboratorio.

Criar los parásitos en ambiente controlado ha permitido tener un seguimiento exhaustivo de gran parte del ciclo biológico. Se ha obtenido una base de datos con los tiempos que necesita la larva para desarrollarse dentro del cuerpo del capóforo, lugar y tiempo necesario de pupación, mortalidades y prevalencias de parasitación por especies. Las observaciones fueron diarias y se añade a continuación una tabla resumen de resultados (Tab.24).

CARPÓFOROS DE <i>P.eryngii</i> CONTAMINADOS FECHA INICIO DE LA CRÍA	FECHA DE SALIDA DE LAS LARVAS A PUPAR . ESTADIO LARVAL APROXIMADO OBSERVADO (I _{1,2,3,4}) ^a . LUGAR DE SALIDA	TIEMPO EN CONSTRUIR EL CAPULLO Y LUGAR	FECHA PUPARIO COMPLETO Y COMIENZO DE LA PUPACIÓN	*LARVAS O PUPAS MUERTAS OBSERVADAS n°	FECHA DE EMERGENCIA DE ADULTOS d/m/y	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE IMAGOS ^b
28/10/2006	a.28/10/2006 b.01/11/2006 Sincronizadamente a.7 larvas "I ₄ " b.14 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	a.3,5h b.1h E.S. ^c	a.28/10/2006 b.01/11/2006	9 larvas 0 pupas	a.06/11/2006 b.07/11/2006	a.3♀ <i>Tarnania fenestralis</i> . b.6♂ y 3♀ <i>Rymosia pseudocretensis</i> .
6/11/2006	07/11/2006 Sincronizadamente 1 larva "I ₃ " Por el interior del pie	1h E.S.	8/11/2006	0 larvas 0 pupas	16/11/2006	1♂ <i>R. pseudocretensis</i> .
15/11/2006	a.16/11/2006 b.17/11/2006 Sincronizadamente a.1 larvas "I ₃ " b.2 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	a.2,5h b.2h E.S.	a.18/11/2006 b.19/11/2006	1 larva 0 pupas	a.23/11/2006 b.28/11/2006	a.1♂ <i>R. pseudocretensis</i> . b.1♀ <i>T. fenestralis</i> .
08/12/2007	10/03/2007 Sincronizadamente 5 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	12/03/2007	2 larvas 3 pupas	---	---
18/12/2007	18/03/2007 Sincronizadamente 8 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	20/03/2007	5 larvas 3 pupas	---	---
02/10/2007	02/10/2007 Sincronizadamente 2 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	1,5h E.S.	03/10/2007	1 larva 0 pupas	10/10/2007	1 Díptero no identificado -Micetophilidae-
12/10/2007	15/10/2007 Sincronizadamente 30 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	N.O. ^d E.S.	18/10/2007	10 larvas 8 pupas	a.29/11/2007 b.29/11/2007	a.2♂ y 3♀ <i>T. fenestralis</i> . b. 3♂ y 4♀ <i>T. fenestralis</i> .
19/10/2007	21/10/2007 Sincronizadamente 5 larvas "I ₃ " Por las láminas	2,5h E.S.	23/10/2007	2 larvas 3 pupas	---	---
05/12/2007	07/10/2007 Sincronizadamente 1 larva "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	9/10/2007	0 larvas 0 pupas	19/10/2007	1 Díptero no identificado -Micetophilidae-
20/10/2007	a.21/11/2007 b.23/11/2007 Sincronizadamente a.10 larvas "I ₄ " b.9 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	a.1,5h b.2h E.S.	a.22/10/2007 b.24/10/2007	5 bajas	a.30/10/2007 b.2/11/2007	a.1♂ y 1♀ <i>R. pseudocretensis</i> . b.5♂ y 7♀ <i>T. fenestralis</i> .
21/10/2007	28/11/2007 Sincronizadamente 11 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	28/10/2007	0 larvas 0 pupas	6/11/2007	4♂ y 7♀ <i>T. fenestralis</i> .
27/10/2007	28/10/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I _{4 max} " Por el interior del pie	2h E.S.	29/10/2007	0 larvas 3 pupas	8/11/2007	1♂ <i>T. fenestralis</i> .
28/10/2007	29/10/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	30/10/2007	1 larvas 2 pupas	---	---
23/10/2007	04/10/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	04/11/2007	0 larvas 0 pupas	18/11/2007	1♂ y 3♀ <i>T. fenestralis</i> Muertos y enterrados
23/10/2007	01/11/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I _{4 max} " Por el interior del pie	1,5h E.S.	03/11/2007	0 larvas 2 pupas	11/11/2007	2♀ <i>T. fenestralis</i> .
2/11/2007	a.08/11/2007 b.12/11/2007 Sincronizadamente	a.2,5h b.3h E.S.	a.09/11/2007 b.14/11/2007	6 larvas 4 pupas	a.18/11/2007 b.27/11/2007	a.3♂ y 6♀ <i>R. pseudocretensis</i> . b.1♂ y 1♀ <i>T. fenestralis</i> .

CARPÓFOROS DE <i>P.eryngii</i> CONTAMINADOS FECHA INICIO DE LA CRÍA	FECHA DE SALIDA DE LAS LARVAS A PUPAR . ESTADIO LARVAL APROXIMADO OBSERVADO (I _{1,2,3,4,5}) ^a . LUGAR DE SALIDA	TIEMPO EN CONSTRUIR EL CAPULLO Y LUGAR	FECHA PUPARIO COMPLETO Y COMIENZO DE LA PUPACIÓN	*LARVAS O PUPAS MUERTAS OBSERVADAS n°	FECHA DE EMERGENCIA DE ADULTOS d/m/y	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE IMAGOS ^b
	a.10 larvas "I ₄ " b.11 larvas "I ₄ " Por el interior del pie					
04/11/2007	06/11/2007 Sincronizadamente 26 larvas "I _{4 max} " Por el interior del pie	1,5h E.S.	07/11/2007	0 larvas 1 pupa	17/11/2007	9♂ y 16♀ <i>T. fenestralis</i> .
03/11/2007	04/11/2007 Sincronizadamente 2 larvas "I ₂ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	04/11/2007	1 larvas 0 pupas	4/12/2007	1 Díptero no identificado
06/11/2007	07/11/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I ₄ " Por las láminas del sombrero	3h E.S.	08/11/2007	0 larvas 2 pupas	16/11/2007	1♀ <i>T. fenestralis</i> .
19/10/2007	22/10/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	23/10/2007	0 larvas 0 pupas	29/10/2007	1♂ y 2♀ <i>R. pseudocretensis</i> .
6/11/2007	12/11/2007 Sincronizadamente 21 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	29/11/2007	0 larvas 1 pupa	08/12/2007	14♂ y 7♀ <i>T. fenestralis</i> .
7/11/2007	a.11/11/2007 b.13/11/2007 Sincronizadamente a.7 larvas "I ₃ " b.13 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	a.2,5h b.2h E.S.	a.13/11/2007 b.15/11/2007	10 larvas 0 pupas	a.19/11/2007 b.23/11/2007	a.1♂ y 1♀ <i>R. pseudocretensis</i> . b.2♂ y 6♀ <i>T. fenestralis</i> .
09/11/2007	10/11/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I _{4 max} " Por el interior del pie	2h E.S.	11/11/2007	0 larvas 0 pupas	22/11/2007	1♂ y 2♀ <i>T. fenestralis</i> .
TOTAL: 23 setas contaminadas						TOTAL ADULTOS: 124 94 <i>T.fenestalis</i> – 76% 27 <i>R.pseudocretensis</i> - 22 % 3 Otros -- 2%
^a Estadios larvales aproximados según el análisis a la lupa realizado. Apartado 3.8.2 ^b Resultados de la identificación taxonómica llevada a cabo. Apartado 3.11. ^c Enterrándose en el suelo (E.S.) ^d Dato No Observado (N.O.)						
*Nota: Para el cálculo de mortalidad en larvas y mortalidad en pupas por especies se toman datos únicamente de las muestras que resultaron estar parasitados por una única especie, no siendo de consideración las repeticiones del estudio que resultaron con puestas de varias especies.						

Tab.24. Recogida de datos de la cría de larvas para la obtención de adultos en laboratorio.

Se han realizado 23 repeticiones del estudio con 220 larvas de las cuales se obtuvieron 124 imagos que fueron identificados taxonómicamente resultando ser ejemplares del Orden Diptera de la Familia *Mycetophilidae*. Las especies con mayor frecuencia has sido *Tarnania fenestralis* (Meigen,1818) y, en menor medida, *Rymosia pseudocretensis* Burghel-Balacesco, 1967.

T.fenestralis ha estado presente en el 72% de los carpóforos de *P.eryngii* contaminados cuyas puestas se han conseguido criar satisfactoriamente. De los 124 adultos resultantes, 94 son de la especie *T.fenestalis*, es decir el 76%.

Los resultados que se obtienen de la cría de larvas realizada en laboratorio se resumen en el gráfico que se muestra a continuación (Fig.44).

Diagrama de Sectores de porcentajes imagos por

Fig.44. Imagos resultantes de la cría de larvas realizada.

El diagrama de sectores muestra la frecuencia con la que se presenta cada resultado en la cría de larvas llevada a cabo: las repeticiones en las que no se ha conseguido obtener ningún imago, las veces en las que aparecen solo imagos de *T.fenestralis*, las veces en que aparece esta especie junto a *R.pseudocretensis*, la frecuencia con que aparece la segunda especie sola y las repeticiones en las que se consigue criar imagos de dípteros no identificados.

Si a los resultados de parasitaciones en las fincas de estudio, que engloban la totalidad de los casos en los que se localizan parásitos en el interior de

carpóforos (ver el apartado 3.1 de éste capítulo), les aplicamos éstos resultados de incidencia del principal parásito resultante de la cría, de *Tarnania fenestralis*, se obtiene la prevalencia de parasitación de *T.fenestralis* en *P.eryngii*:

Prevalencia de parasitación de <i>T.fenestralis</i> en <i>P.eryngii</i>	18 %
---	------

En principio la etología de ambos parásitos parece ser muy similar. Los tropismos observados en todas las larvas han seguido siempre las siguientes pautas:

Todos los tejidos que utilizan para alimentarse son tejidos internos, no dañando las partes externas. Se alimentan de la mayor parte de estos tejidos consiguiendo dejar hueco el sombrero y pie donde solo quedan ya excrementos y restos de muda.

Las larvas pupan enterradas en el sustrato y la salida del interior de los carpóforos se produce siempre por el interior. Este aspecto se aprecia bien en campo: Se pueden observar carpóforos que fueron parasitados y ahora están huecos, aún en pie y sin presencia ya de las larvas, que se encuentran buscando el lugar apropiado para pupar en el sustrato (Fig.66).

Encuentran rápidamente un lugar dónde pupar. Buscan oscuridad enterrándose en el sustrato más próximo. Se adentran hasta a 15cm que se han podido registrar (Fig.44 y Fig.45). Trabajan enérgicamente durante aproximadamente dos horas para tejer los capullos y posteriormente pupan en su interior.

Fig. 44. Larva de T.fenestralis enterrándose para pupar.

Fig. 45. Larva de T.fenestralis enterrada y formando el capullo.

Los capullos son libres, sin encapsular ni anclarse al sustrato. La pupa la desarrollan dentro de los capullos. Transcurrido un tiempo emergen los imagos de forma sincronizada.

Las larvas muertas siempre se registran en el exterior del cuerpo del carpóforo, durante su salida de los carpóforos hacia el sustrato dónde enterrarse para pupar o en su siguiente fase, la formación del capullo, pero no se han registrado larvas fallidas en el interior del carpóforo. El número de muertes registrado durante ésta salida, está relacionado directamente con el tamaño que presentaban las larvas en este momento: Los casos en que las larvas abandonan el cuerpo del carpóforo para pupar con su tamaño máximo ($I_{4\text{máx.}}$) no han presentado mortalidad en este estadio. Casos en que la salida se ha producido prematuramente, presentando las larvas pequeños tamaños, las bajas han sido muy numerosas (60 larvas muertas de 135 larvas inmaduras que salieron a pupar.). Por tanto, la cría de larvas es notablemente más exitosa cuándo las larvas han conseguido pupar con su tamaño máximo, Tab.25 :

	Mortalidad en larvas.	Mortalidad en capullos.
Larvas que pupan en I_4	44%	36,3%
Larvas que pupan en $I_{4\text{máx.}}$ (mayores tamaños)	0%	11,32%

Tab.25. Resultados de la mortalidad en larvas y capullos del estudio de cría. Se comparan los fracasos de larvas que salieron a pupar con tamaños reducidos con las que lo hicieron en su tamaño máximo.

Se analiza estadísticamente la relación entre aquellas muestras que solo resultaron estar parasitados por *T.fenestralis* y las muestras parasitadas por ambos parásitos para comprobar si existe correlación entre sus series de datos o no y determinar si existen diferencias notables entre los ciclos de ambas especies.

Los resultados de mortalidad de larvas y pupas se analizan de dos formas: resultados de la población total (teniendo en cuenta las 23 muestras contaminadas que intervienen en el estudio) y, resultados de los carpóforos parasitados únicamente por *T.fenestralis* (Tab. 24). Seguidamente se estudia la correlación existente entre ambas series de datos.

Primeramente se muestran los resultados estadísticos de la mortalidad en pupa. Ambos intervalos asumen que la población de la cual proviene la muestra puede representarse por la distribución normal, Tab.26 y 27.

Las correlaciones entre la mortalidad de pupas en la población total y la mortalidad de pupas exclusivamente en *T. fenestralis* prueban la poca significancia estadística de ambas variables (se estudió la Correlación momento producto de Pearson, la Correlación por el rango de Spearman, y Correlaciones Parciales),Tab.29. El Análisis de Covarianza tampoco demuestra un tanto significativo de variación conjunta, Tab.30. Por todo ello, resulta que a un nivel de confianza del 95%, no existe correlación significativa entre el % bajas en pupas del total del estudio y el % bajas en pupas de *T.fenestralis* y se pueden indicar porcentajes medios para uno y para otra variable sin estar influenciados entre ambos.

En consecuencia, se trata de datos muestrales provenientes de una distribución normal con una variabilidad muy importante en los mismos. Por ello, los intervalos de confianza de estos datos son muy amplios, Tab.26 y 27:

	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
% bajas en pupa	40.3739	10.5369	18.1429	62.6048
% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>	28.5814	12.8043	-2.74957	59.9124

Tab.26. Mortalidad media de pupas en el estudio de cría de larvas realizado y mortalidad en pupa para *T.fenestralis*.

	% bajas en pupa	% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>
Recuento	18	7
Promedio	40.3739	28.5814
Mediana	15.605	4.55
Moda	0	0
Varianza	1998.47	1147.65
Desviación Estándar	44.7043	33.8769
Coefficiente de Variación	110.726%	118.528%
Error Estándar	10.5369	12.8043
Sigma Winsorizada 5%	44.7043	33.8769
Sesgo Estandarizado	0.721786	0.579357 indica datos distribución normal
Curtosis Estandarizada	-1.54387	-1.19469 indica datos distribución normal

Tab. 27. Resumen de estadísticos de la mortalidad en pupa. Análisis de Normalidad.

Además se realizan las pruebas de Chi-cuadrada y Kolmogorov:

Prueba	Estadístico	Valor-P
Chi-Cuadrado para % bajas pupa <i>T.fenestralis</i>	14.7143	0.0116556
Chi-Cuadrado para % bajas pupa	55.3333	1.05216

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para % bajas pupa *T.fenestralis*

	Chi-Cuadrada	Normal
DMAS	0.285613	0.332428
DMENOS	0.428571	0.199461
DN	0.428571	0.332428
Valor-P	0.152887	0.427773

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para % bajas pupa

	Chi-Cuadrada	Normal
DMAS	0.388001	0.288582
DMENOS	0.499996	0.186646
DN	0.499996	0.288582
Valor-P	0.000246855	0.0997736

Tab. 28. Estadísticos de Chi-cuadrada y Kolmogorov-Smirnov para la mortalidad en pupa. Análisis de Normalidad.

Correlaciones Momento Producto de Pearson.		
	% bajas en pupa	% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>
% bajas en pupa		-0.4952
		(4)
		0.5048
% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>	-0.4952	
	(4)	
	0.5048	
Correlación Ordinal de Spearman.		
	% bajas en pupa	% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>
% bajas en pupa		-0.4472
		(4)
		0.4386
% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>	-0.4472	
	(4)	
	0.4386	
Correlaciones Parciales.		
	% bajas en pupa	% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>
% bajas en pupa		-0.4952
		(4)
		0.5048
% bajas en pupa <i>T.fenestralis</i>	-0.4952	
	(4)	
	0.5048	

Tab.29. Correlación momento producto de Pearson, Correlación por el rango de Spearman, y Correlaciones Parciales para la mortalidad en pupa.

Análisis de Covarianzas		
	% bajas en pupa	% bajas en pupa <i>t. fenestralis</i>
% bajas en pupa	1998.47	-908.0
	(18)	(4)
% bajas en pupa <i>t. fenestralis</i>	-908.0	1147.65
	(4)	(7)

Tab.30. Análisis de Covarianzas para la mortalidad en pupa.

Los datos obtenidos de larvas muertas durante la cría se han contabilizado de las observaciones de larvas muertas en su salida de los carpóforos hacia el sustrato a pupar. En las observaciones bajo lupa de los

tejidos internos de los carpóforos no se han observado larvas fallidas en el interior.

El análisis homólogo pero para la mortalidad en larvas en este caso, resulta que en los carpóforos con puestas solo de *T.fenestralis* no se han contabilizado bajas en el estudio por lo que el porcentaje de bajas en larva para esta especie ha resultado ser el 0%. El análisis de mortalidad de larvas de la población total (teniendo en cuenta los 23 carpóforos contaminados que intervienen en el estudio) ha resultado no provenir de una distribución normal, Tab.31, por lo que únicamente se refleja un intervalo de confianza para la media:

- Intervalos de confianza del 95.0% para la media: [11.9751; 36.6316]

Prueba de Kolmogorov-Smirnov		
	<i>Chi-Cuadrada</i>	<i>Normal</i>
DMAS	0.476062	0.299327
DMENOS	0.499119	0.200673
DN	0.499119	0.299327
Valor-P	0.000254762	0.0794757
<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.80003	0.00107571

Tab.31. Mortalidad en larva. Análisis de Normalidad.

A continuación se analizan los principales factores condicionantes de la cría de larvas realizada a través de Componentes Principales. El propósito del análisis es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las siete variables principales del estudio de la cría de larvas realizado que expliquen la mayor variabilidad en los datos y que muestren las principales diferencias entre los ciclos de ambos parásitos. Los datos/variables principales del estudio han sido:

1. % bajas en larvas (porcentaje del total de larvas que resultaron muertas).
2. % bajas en pupa (porcentaje del total de pupas que resultaron muertas).
3. Tamaño alcanzado en el momento de la pupación.
4. Días pupando (Tiempo desde que se encuentran todas pupando hasta que emergen los imagos).
5. Imagos *R.pseudocretensis* resultantes.

6. Imagos *T.fenestralis* resultantes.
7. Tiempo en realizar la pupa (h)

Análisis de Componentes Principales			
Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	3.14845	44.978	44.978
2	1.68412	24.059	69.037
3	0.821427	11.735	80.771
4	0.760409	10.863	91.634
5	0.439056	6.272	97.907
6	0.146539	2.093	100.000
7	0.0	0.000	100.000

Tab.32. Análisis de Componentes Principales de los datos de la cría de larvas realizada.

Dos componentes se han extraído puesto que dos componentes tuvieron valores mayores o iguales a la unidad, Tab.32. En conjunto ellos explican 69.0367% de la variabilidad en los datos originales.

El primer componente principal tiene la ecuación: $z_1 = 0.533056*\% \text{ bajas en larvas} - 0.257574*\% \text{ bajas en pupa} - 0.490987*\text{código estadio larval} - 0.4429*\text{Días pupando} + 0.269818*\text{imagos R.pseudocretensis} - 0.175829*\text{imagos T.fenestralis} + 0.329486*\text{Tiempo en realizar la pupa}$.

El segundo componente principal tiene la ecuación: $z_2 = 0.173187*\% \text{ bajas en larvas} - 0.442873*\% \text{ bajas en pupa} - 0.127414*\text{código estadio larval} - 0.171859*\text{Días pupando} - 0.285004*\text{imagos R.pseudocretensis} - 0.657713*\text{imagos T.fenestralis} + 0.46291*\text{Tiempo en realizar la pupa}$.

En donde los valores de las variables en la ecuación se han estandarizado restándoles su media y dividiéndolos entre sus desviaciones estándar.

Por último se estudia la relación entre las bajas observadas y el tamaño alcanzado en el momento de la salida a la pupación, distinguiéndose un tamaño óptimo cuando las larvas presentaban grosores y longitudes máximas, tamaño considerado como $I_{4\text{máx}}$ según la descripción de la pág.210, o unos tamaños menores que se han llamado I_4 .

El Análisis de Varianza que relaciona el porcentaje de bajas en pupa con los tamaños de larva alcanzados en el momento de salir a pupar, concluye que no existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95,0%.

Para el análisis análogo de las bajas en larvas resulta que si existe una relación estadísticamente significativa entre las variables bajo el mismo nivel de confianza. Las larvas que salen para pupar como $l_{4\text{máx}}$ muestran una mortalidad muy baja, cercana al valor nulo. Se muestran los principales parámetros de este resultado en la tabla nº 33.

Regresión Múltiple - % bajas en pupa					Regresión Múltiple - % bajas en larvas				
		Error	Estadístico			Error	Estadístico		
Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P	Parámetro	Estimación	Estándar	T	Valor-P
CONSTANTE	77.2295	37.4031	2.06479	0.0580	CONSTANTE	82.2037	14.2385	5.77334	0.0000
código tamaño larval	-9.1695	10.1798	-0.900752	0.3830	código tamaño larval	-15.675	3.87523	-4.04492	0.0012

Análisis de Varianza						Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1681.59	1	1681.59	0.81	0.3830	Modelo	4914.11	1	4914.11	16.36	0.0012
Residuo	29016.1	14	2072.58			Residuo	4204.88	14	300.348		
Total (Corr.)	30697.7	15				Total (Corr.)	9118.99	15			

R-cuadrada = 5.47791 por ciento						R-cuadrada = 53.8888 por ciento					
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 0 por ciento						R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 50.5951 por ciento					
Error estándar del est. = 45.5256						Error estándar del est. = 17.3306					
Error absoluto medio = 40.1751						Error absoluto medio = 11.3033					
Estadístico Durbin-Watson = 1.10283 (P=0.0272)						Estadístico Durbin-Watson = 2.44062 (P=0.8348)					
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.362422						Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.299115					

Tabla nº33. Relación entre las bajas observadas y el tamaño de la larval conseguido en el momento de la pupación.

La regresión Múltiple análoga con variable dependiente el porcentaje de mortalidad total del estudio, sin diferenciar si ocurrió en la fase de pupa o larva, comparado con el estadio larval en el que ocurrió si asume una relación estadísticamente significativa al 95% de probabilidad, verificando la normalidad de ambas series de datos, que validen el análisis. Las correlaciones entre las variables verifican el resultado anterior (se estudió la Correlación momento producto de Pearson, la Correlación por el rango de Spearman, y Correlaciones Parciales), Tab.34.

<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>	
CONSTANTE	92.3995	10.6034	8.71413	0.0000	
código tamaño larval	-15.0239	4.57358	-3.28493	0.0047	
Análisis de Varianza					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7765.32	1	7765.32	10.79	0.0047
Residuo	11514.0	16	719.625		
Total (Corr.)	19279.3	17			
R-cuadrada = 40.278 porciento R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 36.5453 porciento Error estándar del est. = 26.8258 Error absoluto medio = 22.5229 Estadístico Durbin-Watson = 0.931407 (P=0.0054) Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.472945					
Correlación Ordinal de Spearman					
	% mortalidad total	código tamaño larval			
% mortalidad total		-0.5636			
		(18)			
		0.0201			
código estadio larval	-0.5636				
	(18)				
	0.0201				
Correlaciones Parciales					
	% mortalidad total	código tamaño larval			
% mortalidad total		-0.6346			
		(18)			
		0.0047			
código estadio larval	-0.6346				
	(18)				
	0.0047				

Tab.34. Análisis de Correlaciones entre la mortalidad del estudio y el tamaño alcanzado por las larvas en el momento de la pupación.

Para definir el tiempo empleado por las larvas en realizar la pupa se realiza un análisis univariable que concluye un Intervalo de Confianza para la media y otro para la desviación estándar, ambos en horas:

- Intervalos de confianza del 95.0% para la media: 2.27778 +/- 0.389636 [1.88814; 2.66741]
- Intervalos de confianza del 95.0% para la desviación estándar: [0.342387; 0.971097]

En cuanto al tiempo de pupación de ambas especies parásitas, se realiza primero un estudio sobre la variable “días pupando” del total de las muestras en las que aparece *T.fenestralis*, Tab.36, y posteriormente sobre la variable de “días pupando” considerando solo las muestras que resultaron contaminadas

únicamente por esta especie, sin considerar las muestras que resultaron estar parasitadas por más de una especie, Tab.35. Se analiza la variación conjunta de las series, Análisis de Covarianzas, que resulta que ambas series no muestran significación conjunta. El mismo análisis se realiza para *R.pseudocretensis*, Tab.37.

Recuento	15
Promedio	10.2667
Mediana	10.0
Moda	10.0
Varianza	32.0667
Desviación Estándar	5.66274
Coefficiente de Variación	55.1566%
Error Estándar	1.46211
Mínimo	6.0
Máximo	30.0
Rango	24.0
Cuartil Inferior	7.0
Cuartil Superior	10.0
Sesgo Estandarizado	5.37269
Curtosis Estandarizada	9.891

Tab.35. Tiempo de pupación para las muestras en las que aparece *T.fenestralis*.
Estadísticos principales.

El valor de Curtosis estandarizada no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal por lo que únicamente se atenderá a los intervalos de confianza vertidos para la media:

- Intervalos de confianza para la media de los días de pupación de las muestras dónde apareció el parásito *T.fenestralis*, al 95.0%: 10.2667 +/- 3.13593 [7.13074; 13.4026]

Recuento	8
Promedio	9.125
Mediana	10.0
Moda	10.0
Varianza	2.41071
Desviación Estándar	1.55265
Coefficiente de Variación	17.0153%
Error Estándar	0.548944
Mínimo	7.0
Máximo	11.0
Rango	4.0
Cuartil Inferior	7.5
Cuartil Superior	10.0
Sesgo Estandarizado	-0.666574
Curtosis Estandarizada	-0.884529

Tab.36. Tiempo de pupación para las muestras en las que solo aparece el parásito *T.fenestralis*. Estadísticos principales.

Intervalos de Confianza para los días de pupación exclusivos para la especie de *T.fenestralis*:

- Intervalos de confianza para la media de los días de pupación de las muestras dónde apareció únicamente el parásito *T.fenestralis*, al 95.0%: 9.125 +/- 1.29805 [7.82695; 10.423]
- Intervalos de confianza para la desviación estándar de los días de pupación de las muestras dónde apareció únicamente el parásito *T.fenestralis*, al 95.0%: [1.02657; 3.16006]

Recuento	7
Promedio	7.285
Mediana	9.0
Moda	9.0
Varianza	2.01071
Desviación Estándar	1.95265
Coefficiente de Variación	15.0153%
Error Estándar	0.448984
Mínimo	6.0
Máximo	8.0
Rango	3.0
Cuartil Inferior	6.5
Cuartil Superior	8.0
Sesgo Estandarizado	0.988574
Curtosis Estandarizada	1.014522

Tab.37. Tiempo de pupación para las muestras en las que aparece el parásito *R.pseudocretensis*. Estadísticos principales.

Intervalos de Confianza para los días de pupación exclusivos para la especie de *R.pseudocretensis*:

- Intervalos de confianza para la media de los días de pupación de las muestras dónde apareció el parásito *R.pseudocretensis*, al 95.0%: 7.285 +/- 0.805 [6.4345; 8.1355]
- Intervalos de confianza para la desviación estándar de los días de pupación de las muestras dónde apareció únicamente el parásito *R.pseudocretensis*, al 95.0%: [1.8247; 4.16045]

Las muestras en las que únicamente resultó aparecer esta segunda especie han sido solamente dos, con 8 días de pupación en una de ellas y 7 en la otra por lo que no procede realizar análisis estadístico de esta variable.

Se calcula el *sex ratio* de *T.fenestralis*. Los datos de valor nulo serían los casos en que toda la población de esta muestra ha sido de sexo masculino o femenino. Tab.39. Intervalos de confianza para *sex ratio T.fenestralis*:

- Intervalos de confianza del 95.0% para la media: 46.2669 +/- 34.1945 [12.0724; 80.4615].
- Intervalos de confianza del 95.0% para la desviación estándar: [40.5769; 93.4081].

Recuento	13
Promedio	46.2669 (1:2,16)
Mediana	33.33
Moda	0
Varianza	3201.96
Desviación Estándar	56.5858
Coefficiente de Variación	122.303%
Error Estándar	15.6941
Mínimo	0
Máximo	200.0
Rango	200.0
Cuartil Inferior	0
Cuartil Superior	57.14
Sesgo Estandarizado	2.64605
Curtosis Estandarizada	2.95207

Tab.38. Principales estadísticos del *sex ratio* para *T.fenestralis*.

De la misma manera, para el *sex ratio* de *R.pseudocretensis* se tienen los siguientes intervalos, Tab.39:

- Intervalos de confianza del 95.0% para la media: 71.4286 +/- 64.6134 [6.81515; 136.042]
- Intervalos de confianza del 95.0% para la desviación estándar: [45.0198; 153.845]

Recuento	7
Promedio	71.4286 (1:1,4)
Mediana	50.0
Varianza	4880.95
Desviación Estándar	69.8638
Coefficiente de Variación	97.8093%
Error Estándar	26.406
Mínimo	0
Máximo	200.0
Rango	200.0
Cuartil Inferior	0
Cuartil Superior	100.0
Sesgo Estandarizado	1.05206
Curtosis Estandarizada	0.543789

Tab.39. Principales estadísticos del *sex ratio* para *R.pseudocretensis*.

3.8. Estudio del momento de la puesta.

A diferencia de los estudios anteriores, en este trabajo se han utilizado todos los estadios evolutivos del carpóforo de *Pleurotus eryngii* (L₀, L₁, L₂, L₃ y L₄), clasificados según la metodología descrita (Fig.20). incluyendo ahora también el micelio en éstos muestreos.

El estudio se lleva a cabo con un total de 27 ejemplares de hongos que han evolucionado aislados y con ambiente controlado para evitar nuevas parasitaciones. Los resultados se resumen en la Tabla nº 40.

FECHA INICIO AISLAMIENTO	ESTADIO EVOLUTIVO INICIAL	¿EL HONGO REALIZA FUNCIONES BIOLÓGICAS?	ESTADIO EVOLUTIVO FINAL	¿PARASITADO?	CRÍA DE LARVAS E IDENTIFICACIÓN DE ADULTOS
23/10/2007	L ₀	SI	L ₀	NO	—
23/10/2007	L ₀	SI	L ₀	NO	—
23/10/2007	L ₁	SI	L ₂	NO	—
04/11/2007	L ₁	SI	L ₂	NO	—
04/11/2007	L ₁	SI	L ₁	NO	—
10/11/2007	L ₁	SI	L ₁	NO	—
10/11/2007	L ₁	SI	L ₃	NO	—
23/11/2007	L ₁	SI	L ₁	NO	—
23/11/2007	L ₁	SI	L ₃	NO	—
23/11/2007	L ₁	SI	L ₁	NO	—
12/10/2007	L ₂	SI	L ₃	SI - 2 larvas	1 <i>T.fenestralis</i>
23/10/2007	L ₂	SI	L ₄	SI - 4 larvas	4 <i>T.fenestralis</i>
10/11/2007	L ₂	SI	L ₃	NO	—
10/11/2007	L ₂	SI	L ₃	NO	—
10/11/2007	L ₂	SI	L ₃	NO	—
23/11/2007	L ₂	SI	L ₂	NO	—
23/11/2007	L ₂	SI	L ₄	NO	—
23/11/2007	L ₂	SI	L ₄	SI	1 <i>T.fenestralis</i>
23/11/2007	L ₂	SI	L ₃	NO	—
23/11/2007	L ₃	SI	L ₄	NO	—
04/11/2007	L ₃	SI	L ₄	NO	—
23/10/2007	L ₀	SI	L ₁	NO	—
23/10/2007	L ₀	SI	L ₂	NO	—
04/11/2007	L ₁	NO	L ₁	NO	—
04/11/2007	L ₁	NO	L ₁	NO	—

FECHA INICIO AISLAMIENTO	ESTADIO EVOLUTIVO INICIAL	¿EL HONGO REALIZA FUNCIONES BIOLÓGICAS?	ESTADIO EVOLUTIVO FINAL	¿PARASITADO?	CRÍA DE LARVAS E IDENTIFICACIÓN DE ADULTOS
26/10/2007	L2	NO	L2	NO	–
26/10/2007	L2	NO	L2	NO	–
26/10/2007	L2	NO	L2	NO	–

Tabla n°.40. Datos del estudio del momento de la puesta. Los hongos son aislados de nuevos parásitos partiendo desde diferentes estadios evolutivos de sus carpóforos. Las repeticiones del estudio que están oscurecidas se realizaron en campo y el resto en evolucionarios en laboratorio.

De las 27 repeticiones del estudio, 15 cambiaron de estadio en el laboratorio antes de perder su frescura y otros incluso volvieron a fructificar (Fig.46).

Tes ejemplares desarrollaron puestas que albergaban en su interior. Los tres fueron aislados en un estado evolutivo correspondiente al L2 (carpóforos aún no aptos para su recolección por su inmadurez). También los tres cambiaron de estadio en laboratorio. Dos de ellos completaron el ciclo del parásito durante el estudio, pupando sus larvas y resultando en todos ellos imagos identificados como *T.fenestralis*. Resulta entonces que estos parásitos realizan su puesta en los primeros estadios evolutivos del carpóforo y ambos, carpóforo y puesta, mantiene una evolución conjunta.

Por tanto, el estadio evolutivo concreto de los carpóforos en el momento de colocación de las puestas corresponde al L₂, puesto que los hongos que se aislaron de parásitos en estadios previos a este L₂, en todos los casos, resultaron no estar contaminados. Este resultado coincide con estudios sobre boletales y especies parásitas del género *Pegomya* en Finlandia (Hackman y Meinander, 1979; Bruns, 1984). En este trabajo citado se establecieron igualmente cuatro estadios evolutivos del carpóforo en campo.

Fig.46. Hongo de *P.eryngii* fructificado con carpóforos en estadio L_1 y L_2 que evoluciona en laboratorio.

3.9. Cuarentenas de carpóforos aparentemente no parasitados.

Las cuarentenas llevadas a cabo sobre 290 carpóforos de *Pleurotus eryngii* recolectados en estado de evolución L_3 , y que se catalogaron al iniciar el estudio como no parasitadas según el reconocimiento visual descrito, se han aislado en evolucionarios resultando que, 10 de ellas, desarrollaron larvas en su interior, es decir, estaban parasitadas.

Estos resultados se resumen en la tabla nº 41, resultados que se mostraron anteriormente, junto a los resultados del estudio de la prevalencia de

parasitación, Tab.1., pues se consideraron también para determinar dicha prevalencia.

Fecha y Muestreo de setas maduras (estadio L ₃)	Finca de procedencia	Nº setas recolectadas	Nº setas visualmente no parasitadas	Nº de setas visualmente no parasitadas que se someten a cuarentena para verificarlo.	Nº setas parasitadas tras la cuarentena.
Muestreo 0-19/10/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	43 85 300	40 83 241	15 15 15	0 0 0
Muestreo 1-28/10/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	27 353 143	18 334 97	15 15 15	2 1 0
Muestreo 2-04/11/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	14 111 24	12 106 21	10 10 10	1 2 * 0
Muestreo 3-11/11/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	28 39 55	15 25 35	10 10 10	1 0 0
Muestreo 4-18/11/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	30 54 23	18 40 15	10 10 10	0 0 0
Muestreo 5-25/11/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	78 144 314	48 108 243	10 10 10	0 0 0
Muestreo 6-02/12/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	85 399 127	60 290 100	15 15 15	2 0 0
Muestreo 7-09/12/2007	Finca 0 Finca 1 Finca 2	85 64 71	60 50 61	15 10 10	1 0 0
		TOTAL: 2.696 setas recolectadas.	TOTAL: 2.120 setas visualmente no parasitadas.	TOTAL: 290 setas sometidas a cuarentena.	TOTAL: 10 setas resultaron estar parasitadas.

* Este dato se trata estadísticamente de un punto extremo. Analizando este dato en los datos de campo revelan que se trataba de una cosecha con un bajo porcentaje de parasitación que puede resultar atípico según los patrones de parasitación del estudio. Puede intuirse que existía un retraso en las puestas causado por factores externos por ejemplo bajas pluviometrías que se registran en esta fecha. De tal forma que no se apreciaron visualmente las larvas en estos ejemplares porque sufrían una inmadurez anormal. Por tanto, estadísticamente se considera más correcto realizar el análisis sin este dato.

Tabla nº 41. Resultados de las cuarentenas de carpóforos aparentemente no contaminadas.

Los resultados de estas cuarentenas indican que, un carpóforo de *P.eryngii* en su estado de desarrollo óptimo para ser recolectado, si a simple vista no muestra larvas en el interior de sus tejidos, existe una probabilidad muy baja de que las desarrolle: Puesto que los datos muestrales no provienen de una distribución normal, únicamente se atenderá a los intervalos de confianza descritos para la media: 2.6078 +/- 2.0359. El análisis estadístico de estos datos se muestra en el estudio de cálculo de las prevalencias de parasitación (página 131).

En los casos en los que descubrimos larvas de dípteros al procesar este producto (ya sea para su comercialización cómo en el transcurso de conservación para ser consumido) se puede asegurar que estas larvas se

hallaban ya en tamaños apreciables a simple vista en el momento en el que se recolectaron. Si bien es cierto que, para descubrir esta presencia, requiere cortar el carpóforo de la forma descrita en la metodología de este estudio. Estas secciones pueden depreciar el producto para su venta.

Por tanto, los dípteros colocan las puestas en estados inmaduros de los carpóforos, presentando larvas en avanzado estado de desarrollo cuando la evolución del carpóforo se completa.

Una vez recolectado y despojado de su micelio, el carpóforo paraliza su desarrollo, pero se mantiene fresco y realiza ciertas actividades fisiológicas. Se observan en los evolucionarios una serie de síntomas que reflejan la continuación de los procesos biológicos del carpóforo una vez recolectado:

- ✓ Condensaciones en las telas de rafia donde se realizaron las cuarentenas, causa de los procesos de respiración y actividades metabólicas.
- ✓ Diseminación de esporas.
- ✓ Oscurecimiento de las cutículas del sombrero.
- ✓ Conservan su frescura durante aproximadamente dos semanas a temperatura ambiente.

Las secciones practicadas en los carpóforos no fracasan las puestas. Solo reducen la ingesta de las larvas llegando a pesos máximos únicamente las larvas más aptas. Se observa que las cutículas del corte se endurecen actuando como nueva cutícula externa que no interrumpe el desarrollo de la puesta en su interior. Ninguna cutícula externa es dañada por las larvas y es por esto que ningún indicio externo hace pensar que se desarrollan larvas en el interior (Fig.47):

Fig.47.Muestra de sector de carpóforo inicialmente catalogado como no parasitado y que, tras la cuarentena, resultó estar parasitado. También se aprecia que las secciones practicadas para examinar sus tejidos internos no fracasan las puestas.

3.10. Observaciones al microscopio de carpóforos parasitados.

Se extrajeron las cápsulas cefálicas encontradas en los tejidos internos de cada muestra de carpóforos de *Pleurotus eryngii* parasitados y se catalogaron por rango de tamaños. Como se explica en la metodología, no se tienen en cuenta muestras con puestas de diferentes especies para la determinación de estadios larvales por especies. La tabla de los datos del proceso de cría se expone a continuación, Tab.42:

CARPÓFOROS DE <i>P.eryngii</i> "L3" CONTAMINADOS FECHA INICIO DE LA CRÍA	FECHA DE SALIDA DE LAS LARVAS A PUPAR. LUGAR DE SALIDA, SI ES SINCRONIZADAMENTE Y ESSTADIO LARVAL OBSERVADO (I _{1,2,3} O 4)*. d/m/y	TIEMPO EN CONSTRUIR EL CAPULLO Y LUGAR	FECHA DE PUPARIO COMPLETO Y COMIENZO DE LA PUPACIÓN d/m/y	LARVAS O PUPAS MUERTAS OBSERVADAS n°	FECHA DE EMERGENCIA DE ADULTOS d/m/y	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE IMAGOS n°**	RECUESTO DE CÁPSULAS CEFÁLICAS
6/11/2006	07/11/2006 Sincronizadamente 1 larva "I ₃ " Por el interior del pie	1h E.S.	8/11/2006	0 larvas 0 pupas	16/11/2006	1♂ <i>R. pseudocretensis</i> .	3
21/10/2007	28/11/2007 Sincronizadamente 11 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	28/10/2007	0 larvas 0 pupas	6/11/2007	4♂ y 7♀ <i>T. fenestralis</i> .	32
27/10/2007	28/10/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I _{4max} " Por el interior del pie	2h E.S.	29/10/2007	0 larvas 3 pupas	8/11/2007	1♂ <i>T. fenestralis</i> .	12
23/10/2007	04/10/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	04/11/2007	0 larvas 0 pupas	18/11/2007	1♂ y 3♀ <i>T. fenestralis</i> Muertos y enterrados	12
23/10/2007	01/11/2007 Sincronizadamente 4 larvas "I _{4max} " Por el interior del pie	1,5h E.S.	03/11/2007	0 larvas 2 pupas	11/11/2007	2♀ <i>T. fenestralis</i> .	10
04/11/2007	06/11/2007 Sincronizadamente 26 larvas "I _{4max} " Por el interior del pie	1,5h E.S.	07/11/2007	0 larvas 1 pupa	17/11/2007	9♂ y 16♀ <i>T. fenestralis</i> .	76
06/11/2007	07/11/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I ₄ "	3h E.S.	08/11/2007	0 larvas 2 pupas	16/11/2007	1♀ <i>T. fenestralis</i> .	8

CARPÓFOROS DE <i>P.eryngii</i> "L3" CONTAMINADOS FECHA INICIO DE LA CRÍA	FECHA DE SALIDA DE LAS LARVAS A PUPAR. LUGAR DE SALIDA, SI ES SINCRONIZADAMENTE Y ESTADIO LARVAL OBSERVADO (I _{1,2,3} o 4)*. d/m/y	TIEMPO EN CONSTRUIR EL CAPULLO Y LUGAR	FECHA DE PUPARIO COMPLETO Y COMIENZO DE LA PUPACIÓN d/m/y	LARVAS O PUPAS MUERTAS OBSERVADAS n°	FECHA DE EMERGENCIA DE ADULTOS d/m/y	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE IMAGOS n°**	RECuento DE CÁPSULAS CEFÁLICAS
	Por las láminas del sombrero						
19/10/2007	22/10/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I ₃ " Por el interior del pie	2h E.S.	23/10/2007	0 larvas 0 pupas	29/10/2007	1♂ y 2♀ <i>R. pseudocretensis</i> .	9
6/11/2007	12/11/2007 Sincronizadamente 21 larvas "I ₄ " Por el interior del pie	N.O. E.S.	29/11/2007	0 larvas 1 pupa	08/12/2007	14♂ y 7♀ <i>T. fenestralis</i> .	63
09/11/2007	10/11/2007 Sincronizadamente 3 larvas "I _{4 max} " Por el interior del pie	2h E.S.	11/11/2007	0 larvas 0 pupas	22/11/2007	1♂ y 2♀ <i>T. fenestralis</i> .	8

Tab.42. Análisis biométrico de cápsulas cefálicas recogidas del interior de carpóforos. Se realiza este análisis para muestras parasitadas por una única especie.

Tanto en los casos en que el carpóforo estuvo parasitado únicamente por *T.fenestralis* cómo para los casos en que se encontraron únicamente adultos de *R.pseudocretensis* se han podido clasificar 4 estadios larvales: I₁, I₂, I₃ e I₄. No se han encontrado indicios de depredación, no siendo común en estas especies, según la morfología de sus mandíbulas (Krivosheina, y Zaitzev, 2008; Lastovka, 1970). La larva, en su último estadio, se alimenta y aumenta de tamaño para aportar en la pupación el máximo de nutrientes posible y este último tamaño se ha denominado I_{4 max}. Estos estadios se alcanzan a través de 3 mudas.

Las zonas de muda (Fig.48) consisten en galerías ensanchadas que se localizan en los tejidos internos cercanos a las láminas. Se distinguen fácilmente por los restos de muda y cápsulas cefálicas. Los primeros estadios se mueven por los tejidos más internos del sombrero, localizándose las galerías más anchas en las partes inferiores del pie. Las galerías de menor diámetro se localizan en la parte superior del pie, en la inserción con el sombrero.

Con respecto al lugar de colocación de las puestas, se han observado las perforaciones de la cutícula exterior de algunos ejemplares para la colocación de las puestas (Fig. 49). Siempre se han perforado en la parte superior del pie,

cerca de su inserción con el sombrero y siempre en ejemplares jóvenes. Un estudio similar que observó las cutículas de carpóforos parasitados del género *Boletus* dedujo que, cada especie de nematóceros siempre elegía el mismo lugar de puesta, siendo para *Pegomya notabilis* la superficie del sombrero más próxima a las láminas, para *P. winthemi* el extremo de las láminas, para otras varias especies en medio de las láminas y para *P.incisiva* en la parte alta del estipe (Hackman, 1979). Esto denota la especificidad en la ovoposición de los parásitos.

Fig.48. Fotografía al microscopio con objetivo y aumentos SWF15X-4X. Cavity abierta para mudar con restos de cutículas y cápsulas cefálicas.

Fig. 49. Ejemplar inmaduro de *P. eryngii* (estadio L₁) con una perforación en la cutícula causa de una ovoposición.

3.11. Identificación taxonómica de los parásitos resultantes.

Las especies que dañan externamente los carpóforos de *Pleurotus eryngii* han sido gasterópodos, principalmente del Orden Sigmurethra, e insectos del Orden Collembolla.

Los daños que producen los gasterópodos son superficiales, generando depresiones en el sombrero y depreciando estéticamente el producto (Fig.50). Su persistencia en campo se mantiene solamente a principios de la temporada, desapareciendo éstos con las primeras heladas.

Los colémbolos rompen las cutículas exteriores del carpóforo y van alimentándose y penetrando en el tejido interno. Sus poblaciones son

atomizadas en focos localizados del terreno y su tolerancia al frío es baja, por lo que con las primeras heladas de la temporada el insecto también parece dejar de actuar, según se ha observado en los trabajos de campo.

Fig.50. Daños producidos en *Pleurotus eryngii* por gasterópodos, izq., y colémbolos, dcha.

La principal entomofauna asociada a daños internos en carpóforos de *P.eryngii* resultante han sido, como se ha venido adelantando, nematóceros fungívoros. Se trata de especies endoparásitas, micófagos en su fase larval. Los daños que se atribuyen a estas especies son consecuencia del desarrollo de las puestas en el interior de los carpóforos.

La identificación taxonómica del total de las muestras recogidas durante el estudio, periodo 2006 - 2008, fueron 54♂ 71♀ obtenidas por cría controlada de larvas y 3♂ 3♀ obtenidas por captura con atrayentes, ha resultado que en el 78% de los casos se trata de: *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) (Fig.51). Se considera el principal parásito resultante.

No tan abundante pero de importancia (un 20% de los imagos resultantes) se ha registrado una segunda especie: *Rymosia pseudocretensis* (Burghel-Balacesco, 1967) (Fig.60).

■ Clase INSECTA. Orden DIPTERA. Suborden NEMATOCERA. Familia MYCETOPHILIDAE. Subfamilia MYCETOPHILINAE. Tribu EXECHIINI. Género *TARNANIA*.

Fig.51. *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818). ♀ Izq. ♂ Dcha.

Material examinado: ESPAÑA: Castilla y León, Segovia, Boceguillas, UTM: 447476X 4575010Y, 446650X 4576050Y, 446550X 4576000Y, Altitud 990 m.s.n.m., cría de larvas extraídas de *Pleurotus eryngii*, P.Chandler leg. (Royal Entomological Society of London), 2008:28/10/2006, 3♀, 15/11/2006, 1♀, 20/10/2007, 7♀ 5♂, 21/10/2007, 7♀ 4♂, 27/10/2007, 1♂, 23/10/2007, 3♀ 1♂, 23/10/2007, 2♀, 02/11/2007, 1♀ 1♂, 4/11/2007, 16♀ 9♂, 6/11/2007, 1♀, V.Tobar leg. 2008:/11/2007, 7♀ 14♂, 7/11/2007, 6♀ 2♂, 9/11/2007, 2♀ 1♂. ESPAÑA: Castilla y León, Segovia, Boceguillas, UTM: 447476X 4575010Y, 446650X 4576050Y, 446550X 4576000Y, Altitud 990 m.s.n.m., captura por atrayentes proteicos, V.Tobar leg. 2008:28/10/2007, 2♂, 4/11/2006, 1♀, 11/11/2007, 1♀, 18/11/2007, 1♂1♀. TOTAL: 58♀ 40♂

Fig.52. *T.fenestralis* ♀. Ocular SWF5X

Fig.53.Venación alar *T.fenestralis*. Ocular SWF5X

Fig.54 y 55. *T.fenestralis* abdomen ♀. Abdomen ♂ Ocular SWF5X

Fig.56 y 57. *T.fenestralis*. Genitalia ♀. Ocular SWF15X (izq.). Genitalia ♂. Ocular SWF15X (dcha).

Fig.58. *T.fenestralis*. Genitalia ♂. Ocular SWF15X.

Fig.59. *T.fenestralis*. Genitalia ♂. Ocular SWF15X.

La especie *T.fenestralis* es grande y robusta dentro de su tribu Exechiines, la longitud del cuerpo es de 6-9,5 mm. Pueden ser reconocidas por la combinación de los siguientes caracteres: Proepisternum por lo general con una cerda fuerte. Anepisternum dispersos con pequeñas cerdas. Venación alar con subcostal terminando junto a R1, M-bifurcación y Cu-bifurcación sin cerdas, CuP y A1 largas y fuertes (Fig.53). Tibia posterior con varias cerdas curvadas posterodorsalmente, colocada irregularmente en más de una fila. Abdomen con las marcas abdominales pálidas situadas hacia los vértices de los tergitos (Fig.54 y 55). La ramificación ventral del gonostilo del macho tiene cerdas internas confinadas en el margen ventral y su terminalia es tan larga como el segmento abdominal VI (Fig.54 y 55). La rama dorsal interior, Rd (Fig.58), presenta un crecimiento exterior en forma de abanico del margen ventral interior de la rama dorsal. El tergito IX más largo que ancho y el aedeagus es de ancho triangular con surcos anteriores estrechos y en forma de U. La rama media del gonostilo es pequeña y con forma de gancho, Rm (Fig.59). El sexo femenino se diferencia de otras *Tarnania* por la combinación de manchas oscuras del abdomen (Fig.54) y gonapophysis VIII amplia y menos marcada y cortamente ovalados los cercos II, 2,5 o 3 veces más largos que anchos. Su coloración exterior es amarillo-marrón, a diferencia con otras especies que no tienen este fondo amarillo tan marcado y con las rallas que definen el mesonoto menos marcadas y palideciendo uniformemente hacia el área humeral. El laterotergito es amarillo pálido. (Kjaerandsen, 2006; Kjaerandsen, 2011; Rindal *et al*, 2006).

■ Clase INSECTA. Orden DIPTERA. Suborden NEMATOCERA. Familia MYCETOPHILIDAE. Subfamilia MYCETOPHILINAE. Tribu EXECHIINI. Género *RYMOSIA* WINN.

Fig.60. *Rymosia pseudocretensis* Burghel-Balacesco, 1967. ♂.

Localización del Tipo: Int. J. Speleología., 2: 332. Ifri Maareb (Argelia).

Material examinado: ESPAÑA: Castilla y León, Segovia, Boceguillas, UTM: 447476X 4575010Y, 446650X 4576050Y, 446550X 4576000Y, Altitud 990 m.s.n.m., cría de larvas extraídas de *Pleurotus eryngii*, P. Chandler, leg. (Royal Entomological Society of London), 2008: 28/10/2006, 3♀ 6♂, 6/11/2006, 1♂, 15/11/2006, 1♂, 20/10/2007, 1♀ 1♂, V.Tobar leg. 2008:02/11/2007, 6♀ 3♂, 19/10/2007, 2♀ 1♂, 7/11/2007, 1♀ 1♂.

Los machos tienen la cabeza de color marrón oscuro, con partes de la boca de color amarillo. Clípeo también oscuro. Antenas con escape, pedicelo y la base del primer segmento flagelar amarillo, y el resto marrón (Fig.62). Antenas igual en longitud al fémur frontal más la tibia; longitud del sexto segmento flagelar sobre 2 veces su anchura. Mesonoto marrón. Escutelo

marrón claro con dos cerdas. Propleuras amarillas con una cerda Mediotergito, pleurotergito y el resto de pleuras marrones (Fig.62). La longitud del ala 3,5 mm. M- stalk alrededor de 0,5 veces la longitud de la r- m .Cu- bifurcación antes de la base del r- m. Vena Cu llega al nivel de 1/3 de Cu2 . Patas amarillas. Basitaxo aproximadamente 1,2 la longitud de la tibia. Tibia I con 9p, 3v ; Tibia II con 7a, 4d , 4p ; Tibia III con Sa , Sd , 6p . Abdomen. Tergito I-VI marrón oscuro. Tergito II - V con grandes marcas de color amarillo hacia las bases. Genitalia amarilla (Fig.61 y 63).Los adultos de diferentes sexos son muy similares (Zaitzev, 1993).

Fig.61. Terminalia ♂ de R.pseudocretensis.

Fig.62. Propleura de R.pseudocretensis con una cerda identificativa de la especie.

Fig.63 y 64. R.pseudocretensis. Tergito I-VI marrón oscuro .Tergito II - V con grandes marcas de color amarillo hacia las bases (izq.). Cerdas en hilera sobre la tibia (dcha.)

Los daños directos que han generado estos parásitos en los carpóforos de *P.eryngii* son la desintegración de los tejidos internos (Fig.65 y 66), y la aceleración del decaimiento de la misma. Consecuencia de sus parasitaciones o del contacto de los dípteros con los carpóforos, a estos micófagos se les atribuyen otro tipo de daños indirectos que se discuten en el capítulo 4, , apartado 4.4.

Fig.65. Daños asociados a micetofílicos parásitos en *P.eryngii*. Se aprecian las galerías y los excrementos y restos de muda que generan las larvas en el carpóforo.

Fig.66. Daños asociados a micetofilidos parásitos. Carpóforo de P.eryngii parasitado en campo. Los daños generados por las larvas del parásito se producen en los tejidos internos. El interior del ejemplar de la fotografía se encuentra hueco y con presencia de excrementos; los bordes externos del sombrero han sido destruidos por otros predadores (gasterópodos).

3.12. Descripción de los últimos estadios larvarios de los principales parásitos resultantes.

Las mediciones de la longitud total y del ancho y largo de las cápsulas cefálicas realizadas en los últimos estadios de desarrollo de las larvas de *R.pseudocretensis* y *T.fenestralis*, es información que se proporciona en todos los estudios similares que se han consultado, por tanto, se proporcionan también en este trabajo pero no se consideran distintivos de cada especie o es difícil su diferenciación.

Caracteres como los espiráculos torácicos que son bien desarrollados a partir del segundo estadio larval ó I_2 o los espiráculos abdominales que aparecen en desde el penúltimo (caso de *T.fenestralis*) ó incluso únicamente se desarrollan en el último estadio larval o I_4 (caso de *R.pseudocretensis*) sí se han apreciado como distintivos y también se proporcionan sus mediciones. Estos caracteres parecen ser usuales en la identificación de mycetofílicos (Mardwar, 1937).

La descripción de la larva ha sido posible en ambos parásitos, identificando diferencias entre el último estadio y sus previos y diferencias entre las larvas de ambas especies. Se trata de una básica descripción que se apoya en fotografías dado que no se es especialista en la materia y queda a interpretación de lectores más experimentados en estos géneros:

■ Clase INSECTA. Orden DIPTERA. Suborden NEMATOCERA. Familia MYCETOPHILIDAE. Subfamilia MYCETOPHILINAE. Tribu EXECHIINI. Género *TARNANIA*.

Fig.67. *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818). Ejemplar no tratado (vivo) en su penúltimo estadio larvario (I_3).

Material examinado: ESPAÑA: Castilla y León, Segovia, Boceguillas, UTM: 447476X 4575010Y, 446650X 4576050Y, 446550X 4576000Y, Altitud 990 m.s.n.m., cría de larvas extraídas de *Pleurotus eryngii*, 2013: 16/11/2013, 6 I₃ 6I₄, 6/11/2013, 5I₄, 22/11/2013, 2 I₃ 6I₄, 2/12/2013, 4 I₃ 5I₄, V.Tobar y L.Castresana *leg*.

Medidas. Cuerpo, largo 10,50-13,68 mm, ancho 0,50-0,67 mm. Cápsula cefálica, largo 0,43-0,52 mm, ancho 0,40-0,51 mm. Mediciones a la lupa con medidor digital (error $\pm 0,04$ en el largo del cuerpo y de $\pm 0,005$ en el resto de las mediciones). Espiráculos torácicos, largo de la base 7,03 μm , ancho de la base 5,83 μm , altura 10,08 μm . Espiráculos abdominales, diámetro de la base 5,33 μm , altura 4,67 μm . Mediciones al microscopio con ocular escalado (error de $\pm 0,05$).

Las larvas de *T.fenestralis* son apodas y vermiformes, de color blanco translúcido con la cápsula cefálica y espiráculos fuertemente esclerotizados de color negro intenso (Fig.67). El cuerpo consiste en tres segmentos torácicos libres de pseudopatas (a diferencia de la larva de *R.pseudocretensis*, que posee una pseudopata torácica poco desarrollada) y nueve segmentos abdominales con nueve pseudopatas, la primera de ellas entre el último segmento torácico y primero abdominal y, el resto, continuas. Las pseudopatas están todas ellas bien desarrolladas y marcadas con claridad, más largas y robustas que *R.pseudocretensis*, con pequeños ganchos en la planta, distribuidos en hasta quince hileras muy definidas y juntas. Éstos mismos ganchos son mucho más largos y formados en la otra especie y aquí se asemejan más a cerdas o espinas (Fig.73).

Las larvas de la subfamilia Mycetophilinae difieren de otras subfamilias en que la estructura ventral de la cápsula cefálica tiene la peculiaridad de que sus platos convergen en un único punto (Krivsheina, 2010). La cápsula cefálica de *T.fenestralis* tiene una pigmentación fuerte que, incluso tras el tratamiento de 72 horas en Hidróxido de Potasio, persiste en intensidad. De forma triangular y ángulos redondeados. Los márgenes y todas las suturas están aún más

esclerotizadas. El margen posterior de la cabeza no presenta bastones finales como ocurre en los géneros *Allodia* spp., *Epicrypta* spp. ó *Phronia* spp. (Plassman, 1972). La apertura ventral de la cápsula dibuja un triángulo isósceles con la base bien ensanchada y contactando las cápsulas epicraneales ventralmente como a dos terceras partes del largo total de la cápsula. El contacto ventral de estas cápsulas en *R.pseudocretensis* es más bajo, coincidiendo con la mitad de la cápsula cefálica. El margen anterior del clípeo frontal sin incisiones laterales cerca de las antenas y redondeado. El puente tentorial es estrecho. Puesto que son larvas cuya pupa se encierra en un capullo sedoso, se aprecian quetas o sedas en las mandíbulas de algunos ejemplares (Fig.74-76).

El labro y las antenas poseen una esclerotización con quitina transparente. Ésta característica no aparece en *R.pseudocretensis* Fig.-. Éste tipo de quitina es nombrado en la especie *Rymosia gracilipes* para la zona que queda encerrada entre el punto ventral de unión de los platos epicraneales (Madwar, 1937) (Fig.74).

Los espiráculos torácicos de *T.fenestralis* se desarrollan a partir del segundo estadio ó I_2 . Constan de dos aperturas cilíndricas cuya proyección al exterior forma un ángulo de unos 30° y de un peritrema lateral oscurecido. El aspecto global del espiráculo es en forma de silla (Fig.71).

Los espiráculos abdominales también se desarrollan a partir del segundo estadio ó I_2 y tienen únicamente un orificio ancho que ocupa prácticamente toda la superficie superior, con un peritrema menos oscurecido pegado a él. (Fig. 72). Son un total de siete pares de espiráculos (desde el primer segmento abdominal hasta el séptimo) en forma de cono truncado más, un último par, en el noveno y último segmento. El octavo segmento torácico carece de espiráculos. Éste último par de espiráculos se juntan y conforman un peritrema en forma de riñón, que se oscurece a partir del penúltimo estadio larvario, llegando a tonalidades muy intensas en el último estadio. Éste último espiráculo oscurecido presenta otro carácter distintivo de esta especie que no se

desarrolla en *R.pseudocretensis*. El oscurecimiento desaparece tras el tratamiento con Hidróxido de Potasio (Fig.68-70).

Fig.68. Último segmento abdominal de *T.fenestralis* en su penúltimo estadio larvario o *I*₃, donde el oscurecimiento de los espiráculos empieza a apreciarse.

Fig.69 y 70. Último segmento abdominal de *T.fenestralis* en su último estadio larvario o *I*₄, donde el oscurecimiento de los espiráculos es perfectamente apreciable.

Fig.71 y 72. Espiráculos de T.fenestralis. Los torácicos con dos aperturas (Izq.) y espiráculos abdominales con una única apertura. (Dcha.).

Fig.73. Pseudopata de T.fenestralis. Presenta más hileras de pequeños ganchos o cerdas de menor tamaño que en el caso de R.pseudocretensis.

Fig.74. T.fenestralis .Esclerotización con quitina transparente en antenas y labro.

Fig.75. Cápsula cefálica de T.fenestralis vista ventralmente.

■ Clase INSECTA. Orden DIPTERA. Suborden NEMATOCERA. Familia MYCETOPHILIDAE. Subfamilia MYCETOPHILINAE. Tribu EXECHIINI. Género *RYMOSIA* WINN.

Fig.76. Rymosia pseudocretensis Burghel-Balacesco, 1967.
Larvas en el último estadio ó I4 (Izq.) y en el penúltimo estadio o I3
(dcha.).

Material examinado: ESPAÑA: Castilla y León, Segovia, Boceguillas, UTM: 447476X 4575010Y, 446650X 4576050Y, 446550X 4576000Y, Altitud 990 m.s.n.m., cría de larvas extraídas de *Pleurotus eryngii*, 2013: 16/11/2013, 7 l₃¹⁹ 4l₄²⁰, 18/11/2013, 7l₄, 23/11/2013, 6l₃ 6l₄, 2/12/2013, V.Tobar y L.Castresana leg.

Medidas. Cuerpo, largo 4,35-6,08 mm, ancho 1,10-1,47 mm. Cápsula cefálica, largo 0,80-0,85 mm, ancho 0,60-0,63 mm. Mediciones a la lupa con medidor digital (error $\pm 0,04$ en el largo del cuerpo y de $\pm 0,005$ en el resto de las mediciones). Espiráculos torácicos, largo de la base 6,01 μm , ancho de la base 6,7 μm , altura 5,30 μm . Espiráculos abdominales, diámetro de la base 4,66 μm , altura 2,67 μm . Mediciones al microscopio con ocular escalado (error de $\pm 0,05$).

Las larvas de *R.pseudocretensis* son más robustas y de menor longitud que *T.fenestralis*, de color blanco translúcido con la cápsula cefálica y espiráculos menos esclerotizados que en el caso anterior, de color marrón claro (Fig.76). El cuerpo consiste en tres segmentos torácicos con una pseudopata poco definida entre el segmento segundo y el tercero, dato que la diferencia de la anterior especie. Igualmente posee nueve segmentos abdominales con nueve pseudopatas abdominales, la primera de ellas entre el último segmento torácico y primero abdominal y, el resto, continuas. Las pseudopatas están todas ellas poco desarrolladas de forma que son cortas y con la base más ensanchada y ovalada, con grandes ganchos en la planta, formando hasta quince hileras muy definidas y juntas (Fig.84).

La cápsula cefálica de *R.pseudocretensis* tiene una pigmentación suave que, tras el tratamiento de 72 horas en Hidróxido de Potasio, prácticamente se pierde su color. De forma más redondeada que en el caso de *T.fenestralis* y ángulos fuertemente redondeados, aparentando un casco circular. Los márgenes y todas las suturas están aún más esclerotizadas. El margen posterior de la cabeza no presenta bastones finales, siendo, al igual que en el caso anterior, recto. La apertura ventral de la cápsula dibuja un triángulo

¹⁹ Estadio larval anterior al último según la clasificación resultante del análisis biométrico, apt. 3.10.

²⁰ Último estadio larval.

isósceles con la base bien ensanchada y contactando las cápsulas epicraneales ventralmente en el punto medio del largo total de la cápsula. El margen anterior del clípeo frontal sin incisiones laterales cerca de las antenas y redondeado. Los platos laterales poseen 4 pares de fosos sensitivos colocados simétricamente más uno no simétrico. El puente tentorial es estrecho. En esta especie también se aprecian quetas o sedas en las mandíbulas de algunos ejemplares causa de la capacidad para formar un capullo sedoso donde formar la pupa (Fig. 81 y 82).

De las piezas bucales se distingue una mandíbula semicircular con potentes dientes de primer orden: trece en el mismo sentido y, el último, en sentido opuesto. Los dientes de segundo orden conforman una hilera muy definida en el margen de 8 dientes de menor tamaño pero bien definidos y, sin formar alineaciones definidas, al final de la mandíbula, aparecen 8 dientes aislados los unos de los otros. Tanto los dientes de primer orden cómo los de segundo observados en planta reflejan una disposición entrecruzada, no exactamente alineada, por lo que se montan y ladean el uno con su contiguo. La maxila posee catorce dientes en su borde exterior. Son de menor tamaño que los de primer orden de la mandíbula pero están bien definidos. El palpo posee una papila circular grande, una papila tubular cónica y larga y tres papilas circulares más pequeñas y juntas en el extremo superior (Fig.78).

En *R.pseudocretensis* y, a diferencia con *T.fenestralis* únicamente el labro posee una esclerotización con quitina transparente, cubriéndose las antenas de quitina color marrón al igual que el resto de los platos (Fig.81 y 82).

Los espiráculos torácicos de esta especie también desarrollan a partir del segundo estadio ó I_2 pero constan de tres aperturas cilíndricas cuya proyección al exterior comienza junta y diverge en la superficie. El peritrema no esta tan oscurecido (Fig.77 y 83).

Los espiráculos abdominales únicamente se desarrollan en el último estadio larvario o I_4 (Fig. 77) a diferencia de *T.fenestralis* que los desarrolla con

anterioridad y tienen únicamente un orificio ancho que ocupa prácticamente toda la superficie superior, con un peritrema menos oscurecido pegado a él. Son un total de siete pares de espiráculos (desde el primer segmento abdominal hasta el séptimo) en forma de cono truncado más, un último par, en el noveno y último segmento. El octavo segmento abdominal, al igual que en *T.fenestralis*, carece de espiráculos (Fig.76).

Fig.77. Larva de *R.pseudocretensis* en su penúltimo estadio o *I*₃. Este estadio carece de espiráculos abdominales.

Fig.78. Maxila y palpos de *R.pseudocretensis*.

Fig.79. Espiráculo torácico de R.pseudocretensis. Cuenta con tres orificios que parten juntos y divergen hacia la superficie.

Fig.80. Espiráculo abdominal de R.pseudocretensis.

Fig.81. Cápsula cefálica de R.pseudocretensis. Los platos epicraneales confluyen ventralmente en el punto medio de la cápsula. El margen posterior de la cabeza no presenta bastones finales, siendo recto.

Fig.82. Antena de R.pseudocretensis. La esclerotización es similar a los platos epicraneales, siendo esta pieza de quitina transparente en T.fenestralis.

Fig.83. Muda del espiráculo torácico de R.pseudocretensis. La fotografía muestra como el espiráculo del estadio anterior se separa con la exuvia, quedando el nuevo espiráculo del último estadio.

Fig.84. Planta de la pseudopata de R.pseudocretensis. A diferencia con T.fenestralis, los ganchos son mayores.

3.13 Análisis de aromas por micro-extracción en fase sólida- SPME

Se presenta un Protocolo de búsqueda de atrayentes ajustado y diseñado acorde con las características de las parasitaciones estudiadas y que se amolda al hábitat natural de *Pleurotus eryngii*. Tab.43.

Se presentan unos primeros resultados de siete muestreos que se llevaron a cabo. Se ha seguido el protocolo de metodología descrito. Las características del análisis y la instrumentación concreta que se ha utilizado se detallan en la tabla nº 44.

En cuanto a las conclusiones, parece existir diferencia significativa entre los compuestos extraídos de las muestras de carpóforos en diferentes estados de maduración. Uno de estos compuestos se trataría del atrayente buscado, siendo una apreciación muy genérica la que arrojan los primeros análisis realizados. Los resultados por ahora no se consideran concluyentes y suponen la nueva línea de investigación que se está desarrollando.

No obstante, en el apartado Anejos del Capítulo 6, se muestran las series de compuestos y sus diagramas para cada una de las extracciones realizadas.

Método de muestreo	Toma de muestras.	Tipo de fibra	Tipo de muestreo	Tiempo de exposición	Temperatura de exposición	Método de análisis
SPME-fibra	Microextracción en <u>laboratorio</u> : -Selección L ₂ y L ₃ en parcelas -Extracción por arranque -Preparación de la muestra -Procesado De requerirse: Congelado (-15 °C hasta su utilización). Descongelado (3 °C durante 30 min. Procesado de forma inmediata.	100 µm PDMS 85 µm PA 65 µm PDMS/DVB 85 µm Carboxen/PDMS	En espacio de cabeza	tiempo a determinar	temperatura a determinar experimentalmente	SPME-GC-MS
SPME-fibra	Microextracción en <u>campo</u> : -Selección L ₂ y L ₃ en parcelas -Preparación de la muestra -Ajuste del dispositivo de extracción al hongo -Procesado	100 µm PDMS 85 µm PA 65 µm PDMS/DVB 85 µm Carboxen/PDMS	En espacio de cabeza	tiempo a determinar	T ^a ambiente.	SPME-GC-MS

Tabla 43. Protocolo de búsqueda de atrayentes volátiles para el control biológico de los parásitos asociados a *Pleurotus eryngii*.

Método de muestreo	Toma de muestras.	Tipo de fibra	Tipo de muestreo	Tiempo de exposición	Temperatura de exposición	Método de análisis
SPME-fibra	Microextracción en <u>laboratorio</u> :	100 µm PDMS	En espacio	45 min	Inlet:Tª liner	SPME-GC-MS
Cromatógrafo	A.5/04/11. L2 (Completa). 0,0589gr	(Rojas Cod. 57300-V)	de cabeza		210 °C	Liner splitless
HP 5890 A	B.5/04/11. L2 (Sección). 0,0670gr	Columna capilar DB-5			Horno :Tª columna 60	(sin division de flujo)
	C.6/04/11. L3 (Sección). 0,0512gr	30 m * 0,25 mm * 0,25 µm			a 240 °C	Liner Cod. 5181-3316
	D.6/04/11. L3 (Sección). 0,2485gr				Rate: 3°C/min	15psi
	E.7/04/11. L2 (Completa).0,1938gr				Detector FID (detector	Flujo Gas portador (He)=
	F.7/04/11. L3 (Sección). 0,2056gr				de ionización de llama)	1,25ml/min
	G.7/04/11. AIRE.				Tª 250 °C	Tiempo análisis: 60 min
	Congelado (-15 °C hasta su utilización).					
	Descongelado (3 °C durante 30 min.)					
	Procesado de forma inmediata.					

Tabla nº.44. Tabla resumen de los muestreos realizados en análisis de aromas con SPME.

3.14 Referencias bibliográficas del Capítulo 3.

- Amaringo-Cortegano, C. A., Vargas-Isla, R., de Moraes, J. W. y Ishikawa, N. K. (2013). Artrópodos asociados a seis especies de hongos comestibles de ocurrencia natural en Manaus, Amazonas, Brasil. *Biota Amazônia*, 3(3), 54-63.
- Krivosheina, M. y Zaitzev, A. I. (2008). Trophic relationships and main trends in morphological adaptations of larval mouthparts in sciaroid dipterans (Diptera, Sciaroidea). *Biology Bulletin*, 35(6), 606-614.
- Hackman, W. (1979). Reproductive and developmental strategies of fungivorous *Pegomya* species (Diptera, Anthomyiidae). *Alquilo Series Zoológicas*, 20, 62-64.
- Hackman, W. y Meinaider, M. (1979). Diptera feeding as larvae on macrofungi in Finland. *Annal Zoologica Fennici*, 16, 50-83.
- Hiukko, E. (1978). Helttasiaten itioemen kasvunopeudesta. *Sienileht*, 30, 40-42.
- Kjaerandsen, J. (2006). Review of fungus gnats of the genus *Tarnania* Tuomikoski, with a phylogeny of the *Rymosia* s.l. genus group (Diptera: Mycetophilidae). *Insect System*, 37, 217-228.
- Kjaerandsen, J. (2011) *Tarnania Fenestralis* General Description. Fungus Gnats (One-line). Actualizada: 02/05/2010. [Fecha de consulta: 05/09/2013]. Disponible en: www.fungusgnatsonline.com
- Krivosheina, M. (2010). Key to genera of larvae of the fungus gnat subfamily Mycetophilinae (Diptera: Mycetophilidae) of Russia and adjacent countries. *Russian Entomology Journal*, 19 (4), 327-340.
- Krivosheina, N. P., & Zaitzev, A. I. (2008). Trophic relationships and main trends in morphological adaptations of larval mouthparts in sciaroid dipterans (Diptera, Sciaroidea). *Biology Bulletin*, 35(6), 606-614.
- Lastovka, P. (1970). A study on the last instar larvae of some Czechoslovak Mycetophila (Diptera: Mycetophilidae). *Acta Universitatis Carolinae Biologica*, 2, 137-176.
- Madwar, S. (1937). Biology and morphology of the immature stages of Mycetophilidae (Diptera, Nematocera). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 227(541), 1-110.

Plassman, E. (1972). Morphologisch-taxonomische Untersuchungen an Fungivoridenlarven. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 19, 73-99.

Rindal, E. y Sølvi, G. E. (2006). Phylogeny of the subfamily Mycetophilinae (Diptera: Mycetophilidae). *Zootaxa*, 1302, 43-59.

Rollán, M.G. (1989). Plagas y enfermedades del champiñón y las setas. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid*, 32-50.

Tobar, V. (2008). Estudio de la entomofauna asociada a las setas silvestres y ecología del principal parásito de la seta de cardo (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué!l). *E.T.S.I.M. Universidad Politécnica de Madrid*, 57-58.

Zaitzev, A.I. (1993). New and Little known fungus gnats of the genus *Rymosia* Winn. from Russia and middle Asia. Geir E.E.Soli. *Lambillionea*, XCIII, 2 Juin. 211-218.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Revisión bibliográfica de *T.fenestralis* asociado a *Pleurotus eryngii*.

El género *Tarnania* (Diptera: Mycetophilidae) adquiere entidad propia en 1966, incluido hasta entonces dentro del género *Rymosia* (Diptera: Mycetophilidae). Se muestran las divisiones que consideraron para *Rymosia* los diferentes autores, antes de quedar escindido en seis géneros independientes (Tab. 45):

Winnertz (1863) Edwards (1925)	Tuomikoski (1966)	SØli et al.(2000)
<i>Rymosia</i> , Winnertz, 1863	<i>Rymosia</i> , s. str.	<i>Rymosia</i> , s. str.
-	<i>Pseudorymosia</i> Tuomikoski, 1966	<i>Pseudorymosia</i>
-	<i>Tarnania</i> , Tuomikoski, 1966	<i>Tarnania</i>
-	<i>Allodiopsis</i> , Tuomikoski, 1966	<i>Allodiopsis</i> s. str.
-	s.g. <i>Gymnogonia</i> , Tuomikoski, 1966	<i>Synplasta</i> Skuse, 1890
-	s.g. <i>Myrosia</i> , Tuomikoski, 1966	<i>Myrosia</i>
-	s.g. <i>Notolopha</i> , Tuomikoski, 1966	<i>Notolopha</i>

Tabla.45. División del género *Rymosia* Winnertz s. lat. recopilada por J. Kjaerandsen (Kjaerandsen, 2006).

Como sinónimos atribuidos a *T.fenestralis*, (Kjaerandsen, 2006) se registran:

- *Mycetophila fenestralis* (Meignen, 1818)-Meigen (1818).
- *Mycetophila apicalis* (Meigen, 1838)-Meigen (1838)
- *Rymosia fenestralis* (Meigen, 1818)-Winnertz (1863).
- *Rymosia fenestralis* (Meigen, 1818)-Edwards (1941).
- *Rymosia fenestralis* (Meigen, 1818)-Burghele (1965).
- *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818)-Tuomikoski (1966).
- *Tarnania bavaria* (Plasman, 1980)-Plassman (1980), renombrado por Sevcik (2001).
- *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818)-Krivosheina et al., (1986).
- *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818)-Zaitzev (2003).

La descripción de *T.fenestralis* en su fase adulta se atribuye a J. Kjaerandsen (Kjaerandsen, 2006). Claves y descripciones taxonómicas específicas se encuentran en los siguientes trabajos: Chandler, 1994; Tuomikoski, 1996 y Kjaerandsen, 2005, 2006, 2011a y 2011b.

La bibliografía de esta especie es referida principalmente, además de la descripción del imago, a su área de distribución y los hongos hospedantes asociados cuyas referencias se detallan más adelante. Como referencias a su etología o ecología se cita que se considera una especie polífaga generalista utilizando como hongos hospedantes especies de los grupos Gomfales, Poliporales, Boleales, Agaricales y Russulales (Kjaerandsen, 2011a). Además, *T.fenestralis* se ha encontrado en cuevas, criptas y minas donde se refugia para entrar en diapausa tanto estival como invernal (Matile,1970; Kjaerandsen,1993) .

Los hongos hospedantes asociados hasta ahora a éste parásito se muestran en la tabla nº 46. La primera referencia que se ha registrado de esta especie asociándola al hongo *P.eryngii* se ha publicado gracias a los resultados de este estudio (Tobar *et al.*, 2010).

HONGO	REFERENCIA
<i>Cortinarius armillatus</i>	(Rimsaité, 2000) Lituania
<i>Ramaria</i> sp.	(Yakolev, 1994) Rusia
<i>Hygrophorus</i> sp.	(Kurina, 1994) Estonia
<i>Clitocybe riburosa</i>	(Kurina, 1994) Estonia
<i>Clitocybe odora</i>	(Kurina, 1994) Estonia
<i>Cortinarius</i> sp.	(Kurina, 1994) Estonia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Kurina, 1994) Estonia
<i>Agaricus</i> sp.	(Kurina, 1994 ; Zaitzev, 2003) Estonia y Rusia
<i>Pleurotus</i> sp.	(Zaitzev, 2003) Rusia
<i>Bolletus</i> sp.	(Zaitzev, 2003) Rusia
<i>Leccinum</i> sp.	(Zaitzev, 2003) Rusia
<i>Pleurotus eryngii</i>	(Tobar <i>et al</i> , 2010) España

Tabla.46. Relación de hongos hospedantes asociados a *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818). (Kurina, 1994; Rimsaité, 2000; Zaitzev, 2003; Kjaerandsen, 2006; Tobar *et al.*, 2010).

De la misma forma, los dípteros citados hasta ahora asociados con *P. eryngii* son los que se relacionan en la tabla nº 47:

ESPECIE	REFERENCIA
<i>Mycetophila flava</i>	Rimsaité, 2000 (Lituania)
<i>Sciophila eryngii</i>	Chandler, 1994 (Israel)
<i>Mycetophila speyeri</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Bradysia paupea</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Lycoriella mali</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Trichoderma</i> sp.	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Heteropeza pygmaea</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Henria psalliotae</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Mycophila speyeri</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>M. barnesi</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Lestremia cinérea</i>	Ferri y Ciccadone, 1998 (Italia)
<i>Tarnania fesnestralis</i>	Tobar et al, 2010 (España)
<i>Rymosia pseudocretensis</i>	Barzegar et al, 2013 (Irán)

Tab.47. Relación de dípteros asociados a *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué. (Barzegar et al., 2013; Tobar et al., 2010; Rimsaité, 2000; Ferri y Ciccadone, 1998; Chandler, 1994)

Esta especie de *Tarnania* está limitada a la zona Paleártica. En la Península Ibérica, su límite meridional de distribución, se ha citado en Portugal (Chandler y Ribeiro, 1995) y en la España continental (Chandler, 2004). El área de distribución de huésped y hospedante se representa en la siguiente figura (Fig. 85):

Fig.85. Área de distribución de hospedador y hospedante. Elaboración propia con las siguientes fuentes documentales: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=139663 [Fecha de consulta: 5/2/2009. Fecha de última actualización: 09/05/2004]; Bresadola, 1911; Offner, 1929; Hennings, 1991, Chandler y Ribeiro, 1995; Chandler, 2004 y Kjaerandsen, 2006.

4.2 Ecología y etología de *Tarnania fenestralis*. Ciclo biológico del parásito en *Pleurotus eryngii*.

Las poblaciones de *T.fenestralis* en su fase de imago coinciden en el tiempo con la fructificación del hongo hospedante. Si bien, hemos detectado un pequeño desfase entre la primera generación del parásito y la primera floración del hongo.

El díptero parásito, *T. fenestralis*, atraviesa una diapausa estival en forma de pupa desde la primavera anterior comenzando a emerger los adultos poco después de la primera floración del hongo. Emergen de forma sincronizada a la superficie y comienza su proliferación. Por otro lado, el ciclo biológico del parásito es muy corto lo cual provoca la superposición de generaciones en una misma cosecha, comportándose así como especie polivoltina.

Las puestas, en forma de huevos, las introducen los ejemplares femeninos con su ovipositor en el interior de los carpóforos cuando éstos se encuentran en sus primeros estadios, concretamente en el estadio denominado L₂ (Fig.20).El lugar exacto de colocación de las puestas es en algún punto que comprende entre la mitad superior del pie y las láminas del sombrero. A partir de éste momento se desarrolla una evolución conjunta de carpóforo y larvas.

La prevalencia detectada de parasitación en *P.eryngii* ha resultado ser del 18%, es decir, prácticamente uno de cada cinco carpóforos de la pradera estaba contaminado. Esta parasitación, con un 76% de certeza, es producida por *T. fenestralis* de forma que podemos considerar a esta especie como el principal parásito de *P.eryngii* en la zona de estudio (Tobar *et al.*, 2010).

Las larvas son de coloración blanco-transparente, vermiformes, apodas y de hábitos gregarios; la cápsula cefálica, fuertemente esclerotizada, presenta tres lóbulos. Poseen ocho espiráculos entre el tórax y el abdomen; el primero de ellos en el metatórax y, el resto, en segmentos abdominales contiguos a partir del I (Fig.86). Se alimentan únicamente de los tejidos interiores del

carpóforo durante todo el proceso de maduración de éste (entre 2 y 4 días, dependiendo de la temperatura y la humedad).

Fig.86. Larva de *T.fenestralis* en el último estadio evolutivo, L₄ máx.

Durante la patogénesis, estancia de las larvas en el interior del cuerpo del carpóforo, éste continúa su maduración, consigue desarrollar las esporas y realizar la dispersión de las mismas. Finalmente comienza su descomposición natural o estadio L₄, ésta descomposición se acelera debido a las galerías producidas por las larvas.

En su evolución, las larvas pasan por cuatro estadios a través de tres intermudas (estadios denominados L₁, L₂, L₃, L₄). La representación gráfica del desarrollo de los distintos estadios larvarios y el correspondiente grado de evolución del carpóforo se esquematiza en la figura nº 87.

Fig.87. Estados larvares durante la patogénesis del parásito y sus correspondientes estadios evolutivos del carpóforo del hongo hospedante contaminado.

Las larvas, en sus primeros tamaños son prácticamente imperceptibles, el primer estadio larvario I_1 mide una media de 3000 μm de largo y 200 μm de grosor y se posiciona en las zonas más blandas del interior de la seta, que corresponden a la zona de inserción del pie con el sombrero, muy cerca de las láminas, generando una cavidad dónde tienen lugar las dos primeras mudas. A los dos días aproximadamente, pasan de I_1 a I_2 con 4000 μm de largo y, unas pocas horas después, mudan de nuevo y pasan de I_2 a I_3 presentando entonces tamaños medios de 12000 μm de largo y 400 μm de grosor. La figura nº 95 muestra la migración de las larvas en sus primeros estadios, subiendo desde el lugar dónde se produce la puesta (en el tercio superior del pie) hasta la inserción con el sombrero, siempre colocándose en las zonas periféricas para construir una zona individual para mudar (Fig.88).

Fig.88. Lugar de colocación de las larvas en sus primeros estadios. Fotografía al microscopio con objetivo y aumentos SWF15X-4X. Cavidad abierta para mudar con restos de cutículas y cápsulas cefálicas.

Las larvas I_3 abandonan la cavidad ó “zona de muda” y se alimentan vorazmente del resto del interior del carpóforo, sin dañar la cutícula externa del mismo. Dos días más tarde realiza la tercera muda en una galería ensanchada ó regresando a las “zonas de muda”, donde deja la exuvia y emerge el último estadio larvario (estadio I_4). En este último estadio se alimenta y consigue su tamaño máximo (estadio $I_{4\text{máx}}$; con tamaños próximos a 13500 μm de largo y 600 μm de grosor), que siempre ha coincidido con el principio de la descomposición del carpóforo en el campo ó el llamado estadio L_4 (Fig.89). La descripción de los dos últimos estadios larvarios se desarrolla en el *apartado* 3.8.3 del Capítulo anterior.

El carpóforo no presenta en ningún momento síntomas externos de la parasitación.

La parasitación no impide el desarrollo del carpóforo, maduración de las esporas y diseminación. Se desconoce si afecta o varía este proceso. No se ha detectado contacto de larvas con los tejidos superficiales de las láminas o himenóforos, dónde se encuentran los basidios que generan las esporas.

La parte baja del pie es la última región colonizada por las larvas (Fig.89). Llegan a ella en el último estadio, L₄, bajan todas a la vez por el interior del pie y, atravesando por el interior hueco de la raíz del cardo asociado (*Eryngium campestre*), acceden al sustrato para enterrarse, formar un capullo y pupar.

Fig.89. Daños de *T. fenestralis* a carpóforos de *Pleurotus eryngii*.

El hecho de que la parte baja del pie sea la última zona del carpóforo que colonizan las larvas es la razón de que muchos ejemplares recolectados (en su estadio maduro ó L₃) presenten secciones limpias de galerías a pesar de estar parasitadas; en el momento de su consumo aparecerán larvas en su interior. En las fotografías que se muestran a continuación se puede ver como practicamos hasta tres secciones transversales hasta que descubrimos las primeras galerías o cómo en una sección transversal se aprecian las larvas listas para salir al sustrato a pupar, posicionadas al final del pie (Fig.90-93).

Fig.90 y 91. Sección del pie de un carpóforo de *P.eryngii* limpio de galerías (dcha.) y sucesivas secciones transversales hasta que se detecta la primera galería (izq.).

Fig.92 y 93. La parte baja del pie es la última zona que colonizan las larvas. Sección limpia (izq.) y sección con galerías y larvas del interior, (dcha.).

Cuando el carpóforo es seccionado, la cutícula del corte se seca imposibilitando la perforación por las larvas. En este caso, el tropismo natural de las larvas se ve alterado y, en lugar de descender a la base del pie, ascienden y buscan su salida rompiendo las cutículas de las láminas del sombrero ya que su escaso espesor permite sus mandíbulas la rompan y se dejen caer para, rápidamente, enterrarse y pupar. Ocurre esto, por ejemplo, en setas expuestas a la venta o durante su proceso de conservación hasta su consumo.

Fig.94. Larva que abandona el carpóforo por las láminas, para enterrarse, formar el capullo y pupar.

La migración sincronizada hacia la zona de pupación dura aproximadamente 2 horas. Luego se entierran bajo el sustrato, a una profundidad máxima de 15 cm y generan unos capullos sedosos trabajando enérgicamente durante unas dos horas.

La mortalidad en pupa no ha presentado relación significativa con el tamaño de larva que adquirió para pupar. La mortalidad en pupa registrada en el estudio ha sido del 28,6%. En cuanto a la mortalidad en la fase larvaria de *Tarnania fenestralis*, no se ha registrado para ésta especie en exclusiva. La mortalidad en larvas para el conjunto del estudio, incluyendo también muestras carpóforos que estaban parasitados por *T. fenestralis* junto a *R. pseudocretensis*, ha resultado poseer un intervalo amplio (del 12 al 36%) pero mostrando una clara concentración de mortalidad en aquellas larvas que no consiguieron su desarrollo máximo ($l_{4\text{máx}}$) antes de pupar.

El momento en que todas las larvas de un mismo carpóforo deciden salir a pupar sincronizadamente atiende a estímulos no definidos en éste estudio pero parecen estar en consonancia con la evolución natural del

carpóforo: el inicio de descomposición del carpóforo siempre ha resultado posterior a la salida de las larvas de su interior (Fig.95).

Fig.95-97. Larvas saliendo de los carpóforos hacia el sustrato para pupar (arriba izq.) y capullos enterrados ya elaborados.

La pupación dura 9 +/- 1,3 días (Fig.98-100). Transcurridos éstos los puparios se rompen y, también sincronizadamente, emergen los imagos al exterior.

El sex ratio registrado presenta de moda de 0, siendo 3 a 1 todos los casos de sexo femenino. En los casos en que resultan puestas mixtas, el sex ratio resulta de 1:2,21 (prevalencia de de sexo femenino en más del doble).

La vida de los imagos dura unas pocas semanas, no pudiendo definir este dato con exactitud en el estudio puesto que no se ha tenido éxito con alimentación artificial. El ciclo biológico completo se representa en el diagrama de la figura nº 101.

La última generación de insectos de la temporada otoñal de seta de cardi entrará en diapausa hasta el otoño siguiente. Si la meteorología permite que el hongo fructifique durante la primavera, una parte de la población parásita emergerá a la superficie. Los indicios apuntan que la diapausa se sufre en el estado de pupa pero no se ha podido reproducir en laboratorio ni comprobar en campo este hecho. Existe una cita de *T.fenestralis* que ubica su diapausa en el interior de minas (Kjærandsen, 1993), forma que parece ser más común en otras especies de este género menos asociadas a la micofagia.

Fig.98 y 99. Pupa de *T.fenestralis* en diferentes estados de desarrollo.

Fig. 100. Pupa de T.fenestralis en avanzado estado de desarrollo.

Representación del ciclo biológico de *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) (Diptera: Mycetophilidae) sobre el hongo *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. :

Fig.101. Representación del ciclo biológico de *T.fenestralis* descrito en *P.eryngii*.

4.3 Revisión bibliográfica de *Rymosia pseudocretensis* en *Pleurotus eryngii*.

La segunda especie parásita en importancia que refleja el estudio pertenece al Género *Rymosia*. Se trata también de un nematócero fungívoro pero con un área de distribución más meridional que *Tarmanina fenestralis*.

La descripción de *R.pseudocretensis* en su fase adulta se atribuye a Zaitzev en el año 1993 (Zaitzev, 1993). Claves ó descripciones taxonómicas específicas son trabajos de los siguientes autores: Zaitzev, 1993 y 2003; Barcegar, 2013.

Como sinonimia atribuida a *R.pseudocretensis* se encuentra:

-*Rymosia appendiculata* (Lackschewitz, 1937)

Se ha citado recientemente como especie parásita de *P.eryngii* (Barcegar, 2013) y es, como en el caso anterior, polífaga. Los hongos hospedantes asociados se muestran en la siguiente tabla, Tabla 48:

HONGO	REFERENCIA
<i>Agaricus selvaticus</i>	(Ribeiro, 1990) Portugal
<i>Lycoperdon perlatum</i>	(Ribeiro, 1990) Portugal
<i>Melanoleuca melaleuca</i>	(Ribeiro, 1990) Portugal
<i>Macrolepiota excoriata</i>	(Ribeiro, 1990) Portugal
Fam. Hervellaceae	(Zaitzev, 1993) Irán
<i>Pleurotus eryngii</i>	(Barcegar, 2013) Irán

Tab.48. Relación de hongos hospedantes asociados a *Rymosia pseudocretensis* (Burghelle-Balacesco, 1967). (Ribeiro, 1990; Zaitzev, 1993; Barcegar et al., 2013).

R.pseudocretensis está ampliamente extendida en la zona mediterránea (Fig.102.). Su primera referencia en la España peninsular fue en la zona de los Monegros, Zaragoza (Chandler y Blasco-Zumeta, 2001). Anteriormente se citó en Portugal (Ribeiro, 1990, 1991) e Islas Canarias (Ribeiro y Chandler, 1995). En Argelia, Irán y Asia occidental (Bughele-Balacesco, 1966; Chandler, 1994, 2005; Barzegar *et al.*, 2013) y, por el norte en Francia (Matile, 1977) y Alemania (Weber *et al.*, 2007). En el mapa de distribución de la especie que muestra la página web www.faunaeuropaea.org se añaden Italia y Turquía.

Fig.102.Área de distribución de *Rymosia pseudocretensis*. Elaboración propia con las siguientes fuentes documentales: (Bughele-Balacesco, 1966; Matile, 1977; Ribeiro, 1990, 1991; Ribeiro y Chandler, 1995; Chandler, 1994, 2005; Chandler y Blasco-Zumeta, 2001; Weber *et al.*, 2007; Barzegar *et al.*, 2013) y la página web www.faunaeuropaea.org [Fecha de consulta: 31/10/2014. Fecha de última actualización: 09/05/2004].

Hay referencias de esta especie asociada, en su fase adulta, a cuevas en Alemania (Weber *et al.*, 2007) y a galerías de conejos en Aragón, España (Chandler y Blasco-Zumeta, 2001).

4.4 Incidencia de *Tarnania fenestralis* y *Rymosia pseudocretensis* en las producciones silvestres de *Pleurotus eryngii*.

En la revisión bibliográfica realizada sobre ambas especies hemos encontrado referencias que las asocian al género *Pleurotus* en un contexto entomológico: tratan de aumentar los conocimientos sobre este grupo de nematóceros fungívoros y citan los hongos a los que están asociados. Desde el punto de vista de la micología o el cultivo artificial de hongos silvestres, revisando las referencias bibliográficas existentes sobre plagas o daños en *Pleurotus* sp., no se han encontrado referencias a estos parásitos. Los trabajos españoles más desarrollados sobre hongos comestibles del género *Pleurotus* se han realizado en el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón C.I.E.S., Cuenca. Los dípteros registrados como plaga para los carpóforos de éste género son especies de mosquitos de los géneros *Lycoriella*, *Heteropeza*, *Mycophila* y moscas del género *Megaselia*. (García-Rollán, 1978, 1982, 1985 y 1991; Orensanz y Navarro, 1979; Maroto, 1995 y Gea, 2002). La comercialización de hongos cultivados se regula por el Real Decreto 1313/2005, de 4 de noviembre, por el que se aprueba el reglamento técnico de control y certificación de material de multiplicación de hongos cultivados, arroja un listado de organismos nocivos sujetos a control en los cultivos de *P. eryngii* el cual no contempla los insectos parásitos, detallando únicamente dos bacterias y ocho hongos competidores. En cuanto a referencias bibliográficas extranjeras, existe un trabajo recopilatorio sobre dípteros parásitos de carpóforos de hongos del género *Pleurotus* es publicado por el Organismo de Economía, Cooperación y Desarrollo Francés: N° 34. *Consensus Document on the biology of Pleurotus spp. (Oyster Mushroom)*. Paris. 2005. La relación de parásitos que incluye éste trabajo no incluye como insectos parásitos el género *Tarnania*. Si incluye una especie del género *Rymosia*, *R. domestica*, afectando a *P. ostreatus*.

Respecto a la incidencia de éstos parásitos en nuestro estudio los resultados reflejan que un 23,62% de los hongos de las fincas de muestreo están contaminados por micetofílicos, es decir, prácticamente uno de cada

cuatro carpóforos de la pradera se encuentra contaminado. Los responsables de éstas contaminaciones son producidas por *T. fenestralis* (76%), *R. pseudocretensis* (22%) y otros micetofilidos (2%), todo ello al 95% de certeza.

La descripción de los daños que producen los parásitos *T. fenestralis* y *R. pseudocretensis* en la seta de cardo (*Pleurotus eryngii*) son los siguientes (Tobar *et al.*, 2010):

- ✓ *Alteraciones en el sabor del producto.* La seta de cardo es apreciada por los consumidores por ser de aspecto limpio, sabor dulce y texturas suaves. Las alteraciones producidas por las larvas que se crían en su interior enrarecen el sabor, tornándolo más amargo. La ingesta de larvas y excrementos que se encuentran en su interior, cambian su sabor y deterioran su aroma.
- ✓ *Desintegración de tejidos.* Los tejidos de la seta internos son desmembrados y devorados. Si las larvas llegan a su máximo desarrollo pueden dejar el carpóforo hueco, con restos de excrementos en su interior.
- ✓ *Acelera la descomposición del hongo.* Los excrementos y exuvias de las larvas y la apertura de galerías en el cuerpo de la seta favorecen la aparición de bacterias y hongos que aceleran su decaimiento natural. Si bien es cierto que en nuestro trabajo comprobamos que la parasitación no impide la maduración y diseminación de esporas del hongo.
- ✓ *La presencia de larvas vermiformes genera “ascos” en su consumo* (Fig.103). En éste trabajo hemos fijado un umbral límite de agusanamiento de un carpóforo por encima del cual el recolector o comprador lo desecharía para su consumo. Pues bien, para el estudio de mercado realizado se desecharía por superar este umbral el 34% de la compra y para las recolecciones en campo el 17%.

Por otro lado, existen unos daños indirectos que se asocian a los nematóceros fungívoros en general que podrían sumarse a los ya mencionados. Así, las galerías abiertas por las larvas en los tejidos no sólo contribuyen a la diseminación de ácaros y nematodos sino también a la

proliferación de hongos competidores y antagonistas (Tsuda y Futai, 1996; Rimsaité, 2000; Jiménez, 2009).

Así mismo, encontramos referencias sobre dípteros parásitos de hongos que, en sus fases adultas, actúan como vectores de enfermedades: Se han registrado varios nematóceros fungívoros en viveros de plantas forestales, propagando por los sustratos bacterias y hongos (Keates *et al.*, 1989). También se citan nematodos parásitos que poseen fases micófagas y fases entomófagas, como, por ejemplo, le sucede al díptero *Rymosia domestica*, parásito de la seta de ostra (*P. ostreatus*); esta especie propaga la infección de nematodos (ubicados en sus ovarios) a través de las picaduras de sus oviscaptos causando “nudos de nematodos” en las láminas del sombrero. (Tsuda y Futai, 1996). Lo contrario parece hacer el nematodo *Iotonchium californicum*, (Tylenchida: Iotonchiidae), que, en su fase micófaga se alimenta en la zona de las láminas del hongo *Agrocybe praecox* y acaba parasitando al díptero *Mycetophila fungorum* el cual a su vez transmite este nematodo al *Pinus radiata* donde se establece como patógeno (Poinar, 1991).

Fig.103. Daños asociados a los dípteros parásitos en carpóforos de *P.eryngii*. Las larvas vermiformes pueden generar “ascos” en el consumo del producto.

En nuestro estudio, hemos estimado una cifra de depreciación de las recolecciones, cuantificando los daños producidos por dípteros parásitos, que resulta ser de 160 euros por hectárea y mes según se calculó en el apartado 3.3 de Resultados. Ésta pérdida económica puede no suponer una depreciación relevante puesto que, según el proyecto Myasrc llevado a cabo por la Junta de Castilla y León para la regulación y comercialización de setas silvestres en esta comunidad autónoma, *P.eryngii* es un hongo principalmente recolectado para su uso no comercial. Sin embargo, las estadísticas existentes indican que, el poco porcentaje que se destina a la venta, hace que este hongo ocupe el 4º lugar en importancia de recolecciones con fines comerciales (Martínez Peña, 2008).

Como en todas las relaciones simbióticas, y el parasitismo lo es, existen asociados a ésta relación determinados beneficios para la especie hospedante; en éste caso el interés más destacado es que los insectos fitófagos voladores que se asocian a las setas pueden ser de una considerable ayuda en la dispersión de sus esporas y por tanto en su reproducción.

“la micofagia animal ha sido aprovechada para la propia dispersión fúngica. Así, hay hongos que utilizan insectos (Diptera, Collembola, etc.) para propagar sus esporas. Un ejemplo extremo es Phallus impudicus, dotado de un olor putrefacto capaz de atraer a numerosas moscas.” (Martínez-Peña et al., 2003)

También se ha comprobado la eficacia de los nematódicos fungívoros como polinizadores de plantaciones de orquídeas (*Listera cordata*) y liliáceas (*Scoliopus bigelovii*) además de otras muchas planas de flor (Mesler et al., 1980).

En el caso de la parasitación de *Pleurotus eryngii* por los dípteros encontrados este interés no parece producirse puesto que el momento de colocación de las puestas se realiza en etapas inmaduras del hongo. Las esporas en éste momento no son fértiles y, por ello, no puede colaborar en su

diseminación. Por otra parte, tampoco hemos detectado contactos frecuentes de los imagos con los carpóforos maduros. Por tanto, en el desarrollo de nuestra investigación no se ha detectado ningún tipo de beneficio al hongo que provenga de las parasitaciones.

4.5 Las larvas de dípteros en el consumo de hongos silvestres.

Los resultados obtenidos del estudio de mercado realizado en un comercio especializado en venta de carpóforos de hongos silvestres de temporada, reflejan la presencia de larvas de parásitos micófagos en los comercios. El trabajo muestra que las especies *Boletus edulis*, *Lepista candidus*, *Lepista panaelus*, *Higrophorus marzolus*, *Pleurotus eryngii*, *Lactarius deliciosus* y *Cantharellus cibarius* presentan, en mayor o menor medida, larvas de dípteros parásitos en su interior.

La prevalencia de parasitaciones en comercio resultó ser de un 40,3%.

Si consideramos los dos primeros “grados de agusanamiento” “Ga₁” y “Ga₂” como aprovechables para el consumo, y el resto desechables (según la clasificación que se define en la página 66). La depreciación de la compra a causa de los daños producidos por parasitaciones de dípteros, asciende al 34%. Ésta elevada depreciación en setas adquiridas en comercio, contrasta con los no tan elevados Índices de abundancia de parasitaciones en campo (del orden del 23% para *P.eryngii*).

Ésta diferencia se podría explicar porque, durante el tiempo que pasan en el comercio, puestas no desarrolladas pero presentes, acaban desarrollándose, sin embargo, según el resultado del estudio de Cuarentenas de carpóforos aparentemente no parasitados, la probabilidad de que esto ocurra es únicamente del 2,6%. Por otro lado, la contaminación en tienda no se debe considerar ya que no existen galerías en cutículas externas que indiquen el paso de larvas entre los carpóforos almacenados y, la salida para pupar, se detectaría a simple vista así como a los dípteros adultos. En cualquier caso, completar en tienda el ciclo biológico del parásito, implicaría demasiado tiempo

y demasiadas condiciones no propicias para el insecto. Podría tratarse que otras especies de hongos posean una prevalencia de parasitación por dípteros superiores a la que presenta el hongo estudiado en la zona de estudio, produciendo depreciaciones mucho más notables en sus cosechas. Así, es bien conocido que el hábitat de las especies muestreadas, salvo en el caso de la seta de cardo, es la proximidad (lepistas y marzuelos) o el interior (boletus y níscalos) de los montes, zonas más húmedas que podrían albergar mayores poblaciones de dípteros micófagos y diferentes especies.

No existen demasiadas referencias donde se cuantifiquen las prevalencias de parasitación de dípteros micófagos en hongos silvestres en su hábitat natural. Las encontradas citan un 12% de hongos parasitados en bosques talados de hayas en Inglaterra (Russell-Smith, 1979) o un 40% en boletales en pinares boreales (Hanski, 1989).

En cualquier caso, los resultados del estudio de mercado dan cuenta de la presencia de los dípteros micófagos en la cadena de consumo y la normativa vigente en materia de calidad y consumo para setas silvestres en el mercado interior no lo permite: el Real Decreto 2192/1984, de 28 de noviembre, por el que se aprueba el reglamento de aplicación de las normas de calidad para las frutas y hortalizas frescas comercializadas en el mercado interior indica:

*“3. CARACTERÍSTICAS MÍNIMAS DE CALIDAD: En todas las categorías, las setas deben estar: Enteras. Con aspecto fresco. Sanas; se excluyen, en todo caso, las afectadas de podredumbre o alteraciones tales que las hagan impropias para el consumo. **Exentas de insectos y otros parásitos.** Limpias; exentas de restos visibles de productos de tratamientos y restos extraños distintos de tierra de cobertura, no permitiéndose el lavado. Exentas de humedad exterior anormal. Exenta de daños causados por las heladas. Exenta de olores y/o sabores extraños. (...).”*

Tras éstas características comunes para todas las categorías de setas, continúa diciendo la norma:

*“4.CLASIFICACIÓN: 4.1. Categoría EXTRA. Las setas clasificadas en ésta categoría serán de calidad superior (...) **Exentas de insectos ó larvas.** (...) 4.2. Categoría I. Las setas clasificadas en esta categoría deben ser de buena calidad y presentarán la forma, desarrollo, textura y coloración característicos de la especie. A condición de que no afecten al aspecto general, la calidad y a la conservación, pueden presentar ligeros defectos de forma, coloración y pequeñas heridas superficiales. 4.3. Categoría II. Ésta categoría incluye los demás géneros (...) que cumplen las características mínimas de calidad que se definen en el apartado 3 de ésta norma.”*

La ausencia de parásitos en la comercialización de los hongos silvestres también se cita en la última normativa aprobada ha sido el RD 30/2009 para la comercialización de setas silvestres y dice: “las setas frescas deben estar correctamente identificadas, **sin podredumbre o parásitos**, enteras -con sus caracteres anatómicos visibles-, y no pueden venderse mezclas de especies” y en la normativa equivalente a ésta materia, pero para el comercio exterior, también se añade en la categoría I “*Prácticamente exento de insectos y larvas*” y no incluye en el apartado 3. CARACTERÍSTICAS MÍNIMAS DE CALIDAD la norma “*Exentas de insectos y otros parásitos*”.

Sin embargo, el Real Decreto 1313/2005, de 4 de noviembre, por el que se aprueba el reglamento técnico de control y certificación de material de multiplicación de hongos cultivados no refleja insectos parásitos en ninguno de sus aspectos, señalando como “organismos nocivos sujetos a control” a bacterias y hongos antagonistas.

En cualquier caso, las setas que se muestrearon en el comercio presentaron un aspecto exterior saludable y óptimo, sin síntomas externos de parasitaciones. Ésta es una particularidad que tienen los micetófilos parásitos: sus puestas no generan ningún tipo de sintomatología externa, que haga pensar en la presencia de larvas en el interior. Únicamente algunas especies de hongos, al ser parasitados, las picaduras tienen una respuesta que se

manifiesta externamente, de una u otra forma: El niscallo (*Lactarius deliciosus*) se pone verde cardenillo, la *Amanita rubescens* se pone rojo vinoso, algunos Boletus azules (García Rollán, 1989). También en los champiñones, las picaduras de algunos dípteros de la Familia Sciaridae producen erupciones visibles en los sombreros que deprecian la cosecha. Por tanto es difícil detectar larvas a no ser que se seccionen longitudinalmente las setas, práctica no permitida por la norma de calidad, anteriormente citada.

4.6 Propuesta de Control.

Por tratarse de producciones extensivas, controlar los parásitos mostrados en éste estudio hace recomendable estudiar alternativas no químicas que se basen en las características agroecológicas de ésta región, enclave óptimo para el aprovechamiento micológico.

Se considera importante la toma de medidas de control integrado que armonicen las características ecológicas del patógeno con las del cultivo y el medio. Por ello, se proponen y discuten en este trabajo algunas de estas medidas: Se han tomado como referencia las Alternativas de Control integrado propuestas por el MBTOC en el protocolo de Montreal (MBTOC, 2002), se han seleccionado las más adecuadas para la producción extensiva de seta de cardo y se discute la viabilidad de las alternativas seleccionadas, así como su metodología de realización acorde con el ciclo biológico de éstos parásitos.

Por último se hace una propuesta de control químico, dejando patentes sus limitaciones, y se exponen los productos fitosanitarios permitidos analizando el momento de aplicación idóneo para llevarlo a cabo.

4.6.1. Medidas sanitarias.

Una medida sanitaria práctica para mantener controladas las poblaciones de dípteros en las praderas es la extracción del campo de ejemplares agusanados.

Los aficionados a la recolección, al dar con un ejemplar visiblemente agusanado, lo suelen desechar inmediatamente. Queda demostrado en este trabajo que la puesta que engendra el carpóforo continúa su evolución incluso habiendo sido seccionado su pie. Transcurrido un tiempo, los dípteros adultos producirán nuevas parasitaciones en esa misma ubicación. Los “seteros” acostumbran a frecuentar las mismas zonas de recogida y serían ellos mismos, con ésta sencilla medida sanitaria, capaces de controlar las poblaciones y mantenerlas en niveles más bajos. Así, las setas con presencia visible de larvas se deben recoger en cesta aparte y extraerse del campo. Lo ideal sería la quema de los ejemplares, pero lo práctico es, en una bolsa cerrada, desecharlos con las basuras cotidianas.

La eficacia de la medida sanitaria propuesta se muestra realizando una simulación de la misma en una de las recolecciones semanales que se llevaron a cabo: Escogiendo una semana al azar, el 18 de noviembre del 2007, se obtuvieron en una de las fincas de muestreo 54 carpóforos no agusanados, 2 poco agusanados, 5 algo agusanados y se encontraron 7 muy agusanados que se suelen desechar de manera inmediata. Si estos 7 últimos los recogemos en una bolsa cerrada y los extraemos de las praderas productoras, suponiendo un mínimo de una puesta por carpóforo y 10 larvas por puesta, hemos eliminado 70 larvas que, con la mortalidad resultante en los estudios, supone 62 dípteros adultos que eliminamos de la pradera para las sucesivas semanas.

4.6.2 Prácticas culturales.

Las prácticas culturales constituyen otra de las alternativas pero, para poder aplicarlas, es necesario un conocimiento profundo del ciclo biológico del parásito y su comportamiento ecológico. Además, la naturaleza serial del hábitat de *P. eryngii*, la pradera, hace que cada una de estas prácticas deba plantearse con la mayor de las cautelas. Se apuntan someramente algunas de las prácticas culturales que se pueden aplicar para reducir las poblaciones de

dípteros micófagos en producciones extensivas de seta de cardo en la zona de estudio:

a) LABOREO. Es una actividad que actúa en la zona de pupación y que podría influir en la mortalidad de las pupas de forma más activa que otros procedimientos meramente superficiales.

No obstante es una práctica que se desaconseja por destruir los enraizamientos del *Eryngium campestre*, cardo al que micorriza el hongo *Pleurotus eryngii*. Además, la propia ecología de ésta planta, la sitúa en terrenos agrícolas en situación prolongada de abandono: suelos poco evolucionados que establecen una primera pradera como sucesión vegetal natural. El laboreo hará retroceder la sucesión vegetal, volviendo hacia formas heliófilas xerofíticas, anteriores al momento en el que se establecieron las asociaciones micorrícicas entre cardo y hongo.

b) SIEGAS. El efecto de las siegas en la producción de seta de cardo en las praderas se viene observando tras años de prácticas sobre las mismas fincas: tras una siega parece que la producción de seta de cardo cae, no recuperándose hasta la tercera temporada posterior, siguiéndole un repunte muy leve de la producción en su cuarta temporada. Las siegas se deben utilizar con el único fin de mantenimiento de la pradera e impedir que evolucione a formas vegetales más estables, en caso de que éstas existieran. La rotación mínima que se aconseja es cada 5 años y la máxima cada 10 años realizando siegas altas (entre 10 y 20 cm). La época de siega debe ser recién finalizada la temporada otoñal de seta de cardo: Enero. Así, se da la oportunidad de desarrollarse en la pradera una primera comunidad temprana de heliófilas anuales, abonando y enriqueciendo la pradera. El resto del año se regenerará la pradera de herbáceas vivaces, las nuevas partes vegetativas del cardo (*Eryngium campestre*), y alguna comunidad más de heliófilas. En octubre, la nueva temporada ha de iniciarse con la cubierta vegetal restablecida para que *P. eryngii* no reciban la luz solar de forma directa y la vegetación sea capaz de

mantener la humedad, mitigar la evapotranspiración y proteger los carpóforos de las heladas nocturnas.

c) EL MANEJO DEL AGUA. De la experiencia en las praderas productoras se extrae que las praderas que en temporada de setas, han recibido un aporte continuo de agua (por lluvias o riegos), la producción de seta de cardo ha sido mucho mayor que las que han sufrido episodios de sequía. Cuando el suministro de agua es continuo, la producción aumenta progresivamente. Plantearse el uso de los riegos para el control de las poblaciones de dípteros en las praderas implica conocer la capacidad de reacción de las poblaciones parásitas a la sequía. La Temporada 2007 presentó una sequía prolongada y éste hecho originó una caída de la producción de setas. Los parásitos consiguen mantener sus niveles de parasitación, no siendo mayores ni menores a su dinámica habitual, como se pudo apreciar (apartado 3.2 de Resultados). La posibilidad de interrumpir los riegos como medida de control del parásito no resultó eficaz. Solamente se aconseja para fenómenos severos de parasitaciones (plaga) y como último recurso. Se propone interrumpir el suministro de agua durante cuatro semanas consecutivas para que la mortalidad en las poblaciones sean significativas.

a) FERTILIZACIÓN Y NUTRICIÓN VEGETAL. Para el caso de hongos comestibles asociados a comunidades vegetales estabilizadas, como es el caso del *Boletus edulis* en los sotobosques de los pinares de pino silvestre, sí se ha demostrado un aumento de la producción por fertilización (Martínez-Peña, 2003). En este ecosistema, las condiciones intrínsecas de luz y humedad que genera la cubierta arbórea hacen que su sotobosque se mantenga estable y estabilizado, sin riesgo de evolución hacia otras comunidades vegetales. Este hecho permite cierto rango de trabajo y modificación en el sustrato. El carácter dinámico que presentan las comunidades vegetales que forman las praderas, imposibilita el aporte de nutrientes sin obtener una respuesta evolutiva sustancial. La fertilización para los ecosistemas productores de *P. eryngii* se considera limitada, por las características seriales de éste ecosistema, pudiendo conducir a las

comunidades vegetales que lo componen, hacia formas más evolucionadas y menos óptimas para las asociaciones micorrícicas que desarrolla el hongo con el cardo, *Eryngium campestre*. De utilizar la nutrición como herramienta para mejorar las cosechas de seta de cardo y, tal vez, modificar las prevalencias de parasitación de dípteros, ha de estudiarse en profundidad la situación actual de la pradera y el grado evolutivo en el que se encuentran sus comunidades vegetales.

Para mejorar la fertilidad y controlar las plagas y enfermedades también se utiliza la biofumigación que consiste en añadir materia orgánica al suelo. Resulta eficaz en el control de bacterias e insectos, flora arvense y nematodos de modo similar a los pesticidas convencionales, pudiendo también regular los problemas causados por virus al controlar a sus organismos vectores. (Bello *et al*, 2001, 2003, 2008; Barres *et al*, 2006). Ataca a patógenos vegetales de origen edáfico. Esta técnica es de bajo coste y fácil aplicación que puede ser de gran interés en cultivos de bajo retorno económico. Por otro lado se debe recordar que no siempre resulta eficaz en el control de organismos del suelo, puesto que su eficacia suele estar determinada por condicionantes tales como pH, la humedad, la profundidad, el contenido de materia orgánica, la actividad biológica o la temperatura (Bello y Tello, 1998; Bello *et al*, 2001, 2008). Se ha observado que la biofumigación resulta más eficaz cuando se cubre el suelo con un plástico impermeable que evite la pérdida de gases (Ozores-Hampton *et al*, 2005; Díez- Rojo *et al*, 2008). La gran complejidad que rodea estos procesos parece no acompañar el carácter extensivo de estas poblaciones y dificultar el tratamiento en sus aplicaciones pero se quiere apuntar como alternativa.

No obstante, los resultados del análisis estadístico realizado muestran que no hay relación entre la dinámica poblacional del hongo y el parásito, por lo que las siegas, riegos y fertilizantes mejorarían la población de hongo pero no implicarían, en principio, niveles inferiores de parasitación. Algunos autores encuentran una íntima relación entre la dinámica poblacional de hospedante y hospedador, hasta el punto de considerar complejos microhábitats, con

diversas escalas de espacio y tiempo, que conforman un ecosistema efímero de varias sucesiones de poblaciones básicas para la supervivencia de ambos grupos (Horn y MacArthur, 1972; Slatkin, 1974; Levin, 1974; Hanski, 1981; Chesson, 1986).

4.6.3 Control biológico.

El uso de nematodos entomopatógenos para el control de larvas en sustratos es una práctica referenciada también para larvas de nematóceros fungívoros. *Steinernema carpocapsae* se ha estudiado para combatir el esciárido *Bradysia agrestis* afectando a la ovoposición mermando la cuantía de las puestas (Kim *et al*, 2004; Jagdale *et al*, 2007) e incluso para combatir el *Rhynchophorus ferrugineus* ó picudo rojo de las palmeras (Dembilio *et al*, 2010; Llácer *et al*, 2009). El contacto de las larvas de *T.fenestralis* y *R.pseudocretensis* con el sustrato es menor que el presentado por el esciárido anterior y parece difícil aplicar nematodos en el interior de los carpóforos. No obstante puede ser un sistema eficaz de control si éstos nematodos afectasen a las pupas de los dípteros implicados.

El control de el esciárido anterior, *Bradysia* spp. ha sido referenciado utilizando un acaro minador como depredador a este nematócero fungívoro, plaga de jardines boreales (Gillespie y Quiring, 1990).

En cuanto a otros parásitos de larvas de micetofílidos, existen descritos varios protozoos, insectos del Orden Hymenoptera de la Familia Braconidae e incluso un díptero (Madwar, 1937; Poinar, 1992), pero ninguno de ellos ha sido citado específicamente sobre las especies que aparecen en este trabajo.

Existen trabajos multidisciplinarios que asimilan a los fungívoros y sus hongos hospedantes al mutualismo existente entre los grandes herbívoros y sus especies alimenticias preferidas. Consideran una evolución conjunta que influye en dinámicas poblacionales, genética y todos los aspectos que derivan de la especialización (Hanski,1989). Con aparatos digestivos diferentes al de

un herbívoro, siendo los tejidos de los hongos completamente diferentes al de las plantas vasculares, se pueden asemejar los insectos fungívoros más a organismos detritícos que a herbívoros (Martin *et al*, 1981). Todo ello invita a investigar sobre los hábitos alimenticios y reproductivos de estos parásitos.

Las capturas con atrayentes han sido desde hace años un método de control biológico muy utilizado para dípteros. Pueden tener diferentes naturalezas y ser colocados sobre varios tipos de soportes. Todos ellos tienen en común que se precisa un estudio etológico previo del parásito para la elección del atrayente específico y el momento adecuado de su colocación.

La aplicación de estos productos se considera sencilla y adecuada a poblaciones parásitas en producciones extensivas temporales como son las praderas productoras de *P.eryngii*: se instalan, en la finca de muestreos productoras al principio de cada temporada, unas trampas de captura adecuadas, debidamente cebadas con un atrayente, y se retiran al finalizar la producción. La frecuencia en la renovación del atrayente dependerá de las características de cada uno, pudiendo alargar sus tiempos de actuación añadiendo antipútridos o conservantes. Las cantidades de estos caldos son pequeñas, facilitando y economizando la metodología de este tipo de control.

Se proponen como posibles atrayentes específicos:

- Utilización de **feromonas sexuales**: Los atrayentes sexuales pueden ser muy eficaces en el control de poblaciones animales, siendo totalmente específicos. Los hábitos de los dípteros adultos son aspectos no estudiados en este trabajo por lo que no se tienen datos que orienten al respecto.

- Utilización de **Trampas de luz**: Trampas eléctricas de luz se ha venido utilizando como atrayente de insectos voladores nocturnos y también podría funcionar aquí, corriendo el riesgo de afectar a otras poblaciones animales de la pradera. También con nematóceros fungívoros se ha utilizado esta forma de captura no específica (Mesler, 1980; Ribeiro, 1991; Soli, 1994; Andersen y

Kjærandsen, 2001; Chandler, 2006; Cloyd, 2007), siendo una de las luces más exitosas la luz de 530nm de LEDs verde lima (Chu, 2004).

- Utilización de **placas atrayentes engomadas, trampa Malaise o redes de barrido**: Son otros método de captura de insectos voladores. Son placas ligeras de plástico ó papel con colores llamativos para el insecto (amarillos normalmente). Se trata de un método sencillo en su colocación y mantenimiento pero no selectivo, al igual que el anterior. Existen referencias de su uso con nematóceros fungívoros (Chu, 2004; Soli, 1994) e incluso estudios que comparan la trampa Malaise con trampas de luz siendo las capturas mayores para la segunda (Andersen y Kjærandsen, 2001).

Atrayentes basados en **señales olfativas** obtenidas. En este trabajo se utilizó un compuesto azucarado como posible alimento de los dípteros parásitos en su fase adulta, proteína hidrolizada al 30% (Smellfol), atrayente. Los resultados no reflejaron disminución porcentual de carpóforos agusanados en la parcela, actuando el atrayente únicamente en un 7,3% de las capturas sobre los principales dípteros parásitos. Parece interesante buscar estas señales olfativas directamente emitidas por el hongo hospedante: El control biológico por atrayentes que emite el hongo en el ámbito de la micología silvestre se está llevando a cabo principalmente con el género *Tuber* y el díptero parásito *Suilla* sp. (García Montero *et al*, 2007).

Si se consiguiese el atrayente natural que induce la puesta de los dípteros en *P.eryngii* y, en caso de poder sintetizarlo o capturarlo, sería la herramienta más precisa para controlar las poblaciones de sus parásitos. Éste hecho, sumado a un aumento de conocimientos sobre las principales especies parásitas asociadas a este hongo que ha proporcionado el presente estudio, deja abierta una nueva línea de investigación que se inició en el año 2013.

Se presenta una metodología de trabajo con un protocolo de búsqueda ajustado para este fin, utilizando el análisis de aromas con microextracción en fase sólida (apartados 2.12 de Material y métodos y 3.13 de Resultados). El principal aspecto característico para este protocolo es que el momento exacto

de muestreo para la captura de aromas debe coincidir con el momento evolutivo del carpóforo en que se produce la parasitación, identificado en este trabajo y suponiendo aquí que existe un aroma emitido por el hongo que induce a la parasitación del insecto. También se identifica el lugar concreto de colocación de las puestas, el tercio superior del pie del carpóforo, dato importante para la búsqueda de atrayentes. El resto de la metodología de éste análisis de aromas se elige y ajusta para la producción extensiva de *P.eryngii*, acorde con el ciclo biológico de éstos parásitos.

Los primeros resultados de la práctica de este protocolo se han recogido este mismo año y no se pueden considerar, a día de hoy, concluyentes. Éstos resultados se incluyen en el Anejo del Capítulo 7. Se sigue trabajando utilizando dicho protocolo, tabla 43 de la página 214.

4.6.4 Formas químicas de control. Productos fitosanitarios permitidos.

Los pesticidas se hacen más sencillos bajo ambientes controlados como es el cultivo intensivo de setas. Las alternativas químicas son una solución a corto plazo, pues en breve habrá que tener muy en cuenta: Medidas sanitarias, Prácticas culturales, Control Biológico, Control físico y todo ello combinado nos lleva a un Control integrado de plagas (Fernández, 2002).

Los tratamientos químicos para cultivos micológicos intensivos están bien estudiados (Fletcher *et al.*, 1989; Fontevedra *et al.*, 1995), pudiendo diferenciarse dos tratamientos, dependiendo de su momento de actuación:

A) Tratan el sustrato, antes o después de la inoculación del hongo pero previo a la presencia de carpóforos: desinfectantes, fungicidas, antibacterianos etc.

B) Tratan el ambiente, con los carpóforos ya presentes: únicamente se pueden utilizar productos sin carácter residual como piretrinas. Caso de emplear en estos momentos productos con riesgo para la salud, las fichas de seguridad aconsejan que se aplicarán solo en ventanas, lámparas o

puertas. Estas sustancias no se pueden usar en el exterior porque se degradan con relativa facilidad por la acción de la luz y del calor (Bullivant y Pattenden, 1976; Goldberg et al, 1965).

El registro de productos fitosanitarios permitidos para cultivos micológicos intensivos, aprobado en el 2012 por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente es el que se muestra en la figura nº 104.

Materia activa	Formulación	Acción	Aplicación	Plazo de seguridad	Marcas comerciales
Azadiractin	3,2% [EC] P/V	Insecticida	0,1-0,15% 0,04-0,06%	3 días	Oris-Aza Align
Ciromazina	75%[WP] P/P	Insecticida	50-100 g diluidos en 50 litros de caldo por 100 m ²	15 días	Trigard 75 WP, Clave, Kavel, Cliper, Rimad, Tribel, Jet 75 WP, Cyro 75 WP, Tiger, Ciromex 75, Triller, Cyromec, Cironac 75, Torrente, Manga, Pirus, Zyro 75, Pendulo, Cironut igr, Spinaker, Salpa, Helozina 75, Cyromaz 75
Deltametrin	2,5% [EC] P/V	Insecticida	0,03-0,05%. Aplicar la dosis en 50-100 litros de caldo por 100 m ² de área de cultivo	3 días	Decis
Deltametrin	6,25% [EG] P/P	Insecticida	0,012-0,02%. Aplicar 50-100 l de caldo por 100 m ² (2/3 al cultivo y 1/3 en el local)	3 días	Decis micro
Diazinon	60% [EW] P/V	Insecticida	0,5%. Utilizar 0,53 litros por m ²	15 días	Basudin EW
Diclorvos	20% [EC] P/V	Insecticida	25 cm ³ /100m ³	No procede	Oromyzus-20 LE, Apavap 20 LE
Diflubenzuron	25% WP	Insecticida	4 g/m ²	No procede	Dimilin-25, Kitinex 25 PM, Progerm, Pingus, Diflupec, Barre 25 WP, Difuse 25 WP, Benzuron 25, Notam
Iprodiona	50% [SC] P/V 50% [WP] P/P	Fungicida	0,1-0,15%	45 días	Rovral aquaflo Rovral WP, Chipco WP
Procloraz	46% [WP] P/P	Fungicida	0,03-0,05%. Aplicar en pulverización normal o riego utilizando 1 litro de caldo por m ²	2 días	Sporgon, Castafiore
Procloraz	45% [SC] P/V	Fungicida	0,5-1 ml de producto por m ² de cultivo	8 días	Verage 45 SC
Orto fenil fenol	9% (57 g/tableta) [FT] P/P	Desinfectante	0,02-0,04 tabletas por m ²	No procede	Deccofofenato-Tab
Orto fenil fenol	6,5% [SL] P/V	Desinfectante	2-3%	No procede	Brillorto, Stribox-P

Fig.104. Registro de productos fitosanitarios autorizados en su aplicación para productos micológicos (MAGMA, 2014).

Los tratamientos químicos para producciones micológicas extensivas no están prácticamente desarrollados. Factores de rentabilidad económica, periodos de cuarentenas, atomización en la localización de praderas productoras etc. parecen condicionar que los tratamientos químicos no se contemplen aún para las setas silvestres. Pocos productos fitosanitarios incluyen en sus espectros de actuación a los hongos. Dificultad añadida son los

tratamientos fitosanitarios aplicados en época de lluvias, que minimiza sus efectos y obliga a concentrar más las dosis.

Gracias a la monitorización y seguimiento de las parasitaciones y la producción del hongo en las praderas se ha definido un momento preciso de actuación en caso de optar por un tratamiento químico para el control de las poblaciones de dípteros fungívoros y se desarrolla una propuesta de tratamiento:

Primeramente solo se considerará rentable y eficaz un tratamiento químico incidente en la temporada otoñal de fructificación de *P.eryngii* (octubre-diciembre). La Temporada primaveral (abril-mayo) presenta carácter irregular, con cosechas esporádicas, y prevalencias de parasitaciones bajas.

En cuanto a la zona de ataque, una actuación en profundidad que incida en las pupas sobre estivación. Éstos parásitos sobreviven al verano en sus formas puparias enterrados en el suelo. Para el cultivo intensivo, es muy común esta práctica de desinfección de sustratos previos a la producción, pero, en campo, es difícil llegar a dañar las pupas (registrándose su localización a profundidades de hasta 15 cm) sin afectar a otras poblaciones animales ó vegetales del ecosistema. De realizarse un tratamiento químico que actúa en profundidad, la época adecuada será 15 días antes de la “florada” que marca el inicio de temporada, nunca durante la temporada pues las cuarentenas que se asocian a éstos productos fitosanitarios suelen ser demasiado largas para una producción temporal cómo la de la seta de cardo. Los productos a utilizar en éste momento podrían ser, en principio, los mismos que se autorizan para los cultivos micológicos intensivos, vistos anteriormente.

La posibilidad de actuar contra las larvas es difícil debido a que todo el periodo larval se produce en el interior de los tejidos vivos de la seta y la salida para pupar tiene un tiempo muy limitado (unas dos horas) y suele llevarse a cabo por el interior del pie y de éste al interior de la raíz hueca del cardo. La aplicación de insecticidas durante la patogénesis puede alterar las

características organolépticas de la seta y pueden no cumplirse los plazos de seguridad.

Es más recomendable incidir sobre las poblaciones de dípteros de la pradera actuando contra los imagos, más vulnerables y con un “ambiente de vuelo” muy localizado (unos 7cm sobre la superficie y siempre cerca del cardo asociado a la seta: *Eryngium campestre*) (Chandler, 1977; Russell-Smith, 1979).

Tampoco esto parece sencillo puesto que, cuando se detecta la presencia del mosquito, ya se encuentran los micelios activos y fructificando con lo que se recomienda utilizar insecticidas a base de Piretrinas, no residuales.

Según las dinámicas poblacionales que han mostrado parásito y huésped, la aparición de la producción de setas va unos días por delante que la aparición de su parásito, mostrándose, en la primera recolección abundante de *P. eryngii* que marca el inicio de la temporada, muy bajos índices de parasitación según se muestra en la tabla nº 48. La fumigación ha de ser eficaz en este momento: Se procederá a la fumigación 3 días después de la primera recolección abundante de la temporada. En este momento existen parásitos adultos en la pradera pero a penas habrá setas emergidas. Para mejor comprensión se muestra la figura nº 86.

Esta recolección es sencilla de reconocer; se produce en el mes de octubre, marcando el inicio de la temporada de seta de cardo con una gran “florada”²¹ que presenta prevalencias de parasitación bajas, gracias al desfase que existe entre la respuesta de la producción de setas y la normalización de las poblaciones del díptero. La pradera estará preparada para generar esta “florada” cuándo haya adquirido una humedad cercana a su capacidad de campo y se produzca una lluvia abundante.

21 “floradas”: Los aficionados a la micología llaman así al fenómeno explosivo de fructificación de un hongo, que acompaña a unas lluvias y temperaturas óptimas para la producción de cierta especie de seta, y que genera cosechas muy abundantes.

Una fructificación abundante de buena calidad puede producirse también tras un periodo de sequía prolongado e incluso para lluvias fuera de la temporada otoñal, en las que las condiciones del campo y la temperatura sean propicias, como ocurrió en el mes de mayo del 2008, y que sirve de ejemplo claro de localización de éstas “floradas” (Tab.49).

Tabla registro de recolecciones abundantes de buena calidad que marcan el inicio de temporada de *P.eryngii*.

Año	Fecha	Nº carpóforos recolectados	Bajos índices de parasitación	Tª (°C)	Precipitaciones inmediatamente anteriores a la recogida (mm)
2006	12-Oct.	805 setas	13,7% parasitadas	Tªmáx=18°C	pp asociada=28mm
2007	19-Oct.	428 setas	9,7% parasitadas	Tªmáx=20,5°C	pp asociada=4mm tras un periodo de sequía
2008	18-May.	695 setas	6% parasitadas	Tªmáx=20,6°C	P asociada = 345mm

Tab. 49. Características climáticas y producción de *P.eryngii* en la primera recolección de la temporada. Marca el inicio de la fructificación de los micelios.

Ahora los micelios del hongo ya han activado su fructificación y continúan generando nuevas setas. Al mismo tiempo, se ha producido la respuesta del díptero que activa sus pupas, emergiendo los imagos y parasitando a esta segunda generación de setas en su estadio L₂. Desde este primer momento los parásitos presentan un nivel poblacional fluctuante pero ya cercano a sus valores medios.

Éste es el momento exacto en el que ha de realizarse la fumigación pues la primera generación de dípteros adultos esta restablecida y coincide con la segunda generación de setas que aún no han emergido a la superficie. Hay que evitar que las setas se encuentren emergidas en el momento del tratamiento químico y atender a los tiempos de cuarentena establecidos (fig. 105).

La evolución normal de la prevalencia de parasitaciones es aumentar progresivamente a medida que nos adentramos en la temporada de setas. La recolección siguiente ya presentará unos niveles de parasitación cercanos a la media, 23%, y la presencia del díptero se notará a simple vista en la pradera. Las sucesivas generaciones de setas empiezan a confluir en el tiempo,

presentando un mismo micelio, en un momento dado, setas en diferentes estadios evolutivos. Los tratamientos fitosanitarios en estos momentos ya no serán tan precisos ni estratégicos cómo lo eran 3 días después de recoger la florada que marcó el inicio de temporada y los riesgos en el consumo de las setas tratadas aumentan.

Fig.105. Representación de cómo localizar el momento óptimo para aplicar un tratamiento fitosanitario en las praderas.

4.7 Referencias bibliográficas al Capítulo 4.

- Andersen, T. y Kjærandsen, J. (2001). Adult caddisfly diversity along a headwater stream in south eastern Ghana (Insecta: Trichoptera). *Verhandlungen der International Vereinigung der Limnologie* 27, 3613-3618.
- Barres, M.T., Bello, A., Jordá, C., Tello, J. (2006). La eliminación del Bromuro de Metilo en la protección de cultivos como modelo mundial para la conservación del medio ambiente. *Univ. Almería, MAPA, Madrid*, 515.

Barzegar, S., Zamani, A. A., Abbasi, S., y Shooshtari, R. V. (2013). First records of the fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae) reared from fruiting bodies of agaric fungi in Kermanshah province, Iran. *Journal of Crop Protection*, 2(2), 163-169.

Bello A, López Pérez, J.A., Díaz Viruliche, L., Tello, J.C. (2001). Alternatives to methyl bromide for soil fumigation in Spain. In: R Labrada, L Fornasari (eds). *Global Report on Validates Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation. FAO Plant Production and Protección* 166, 33-46.

Bello, A., López Pérez, J.A., García Álvarez, A. (2003). Biofumigación en Agricultura Extensiva de Regadío. Producción integrada de Hortícolas. *CSIC-Caja Rural de Alicante, Mundi-Prensa, Madrid*, 670.

Bello A, López Pérez, J.A., Díez Rojo, M.A., López Cepero, J. García Alvarez, A. (2008). Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura*. 729. 19-29.

BOE (2005) Real Decreto 1313/2005, de 4 de noviembre, por el que se aprueba el reglamento técnico de control y certificación de material de multiplicación de hongos cultivados. *Boletín Oficial de Estado núm. 278, 21 de noviembre de 2005*, 37987-37991.

Bresadola, G. (1911). *Fungi congoenses*. Friedlaender y Sohn. Berlin, 17.

Burghelle-Balacesco, A. (1967). Les Mycetophilidae (Diptères) cavernicoles de la collection Biospeologica (IVe-VIIIe séries des "Grottes visitées"). *International Journal of Speleology*, 2, 319-334.

Bullivant, M.J. y Pattenden, G. (1976). Photodecomposition of natural pyrethrins and related compounds. *Pesticide Science*, 7 (3), 231-235.

Cháfer Pericás, C. (2006). Tesis Doctoral. Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía. *Universidad de Valencia*, 83-95.

Chandler, P. (1977). Studies of some fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae) including nine additions to the British list. *Systematic Entomology*, 2, 67-93.

Chandler, P. (1994). The fungus gnats of Israel (Diptera :Sciaroidea, excluding Sciaridae). *Israel Journal of Entomology*, 28, 1-100.

- Chandler, P. (2004). *Rymosia pseudocretensis* Burghele-Balacesco, 1966. Fauna Europaea (One-line). Actualizada: 24/09/2004. [Fecha de consulta: 05/03/2012]. Disponible en: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=139729
- Chandler, P. J. (2006). Additions and changes to the British fauna of fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae). *British Journal of Entomology Natural History*, 19, 77-89.
- Chandler, P., y Ribeiro, E. (1995). Sciaroidea (Diptera)(excluding Sciaridae) of the Atlantic islands (Canary Islands, Madeira, and the Azores). *Boletim do Museu Municipal do Funchal* 3, 1-170.
- Chandler, P. y Blasco-Zumeta, J. (2001). The fungus gnats (Diptera, Bolitophilidae, Ketoplatidae and Mycetophilidae) of the Monegros Region (Zaragoza, Spain) and five other new European species of *Pyratula* Edwards and *Sciophila* Meigen. *Revista entomológica de Aragón*, 9, 1-24.
- Chesson, P. L. (1986). Environmental variation and the coexistence of species. *Community ecology*, 240, 54.
- Chu, C. C., Simmons, A. M., Chen, T. Y., Alexander, P. J., y Henneberry, T. J. (2004). Lime green light emitting diode equipped yellow sticky card traps for monitoring whiteflies, aphids and fungus gnats in greenhouses. *Insect Science*, 11(2), 125-133.
- Cloyd, R. A., Dickinson, A., Larson, R. A., y Marley, K. A. (2007). Phototaxis of fungus gnat, *Bradysia* sp. nr *coprophila* (Lintner)(Diptera: Sciaridae), adults to different light intensities. *HortScience*, 42(5), 1217-1220.
- Dembilio, Ó., Llácer, E., Martínez de Altube, M. D. M., y Jacas, J. A. (2010). Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in Phoenix canariensis. *Pest management science*, 66(4), 365-370.
- Díez Rojo, M.A., López Pérez, J.A., Arcos, S.C., González, M.R., Robertson, L., Guerrero, M., Ros, C., Lacasa, A. Torres, J.M., Bello A. (2008). Soil biodisinfection as an alternative to soil fumigants. *5th Int. Congress of Nematology*, 13-18 jul., Brisbane, Australia, 133p.
- Fernández, N. (2002). Scaramuza Pandini: una personalidad en la historia de la sanidad vegetal, *La Habana, Fitosanidad* 6(2):51-61.

Fernández Durántez (2002). Conferencia Internacional sobre Alternativas al Bromuro de Metilo. *Vida rural* 151, 49-51

Ferri F., Ciccarone C., (1998). Parassiti ed inquinanti nella coltivazione del *Pleurotus eryngii*. *Agricoltura Ricerca anno XX*, 174, I-XXXIX.

Fletcher, J. T., P. F. White y R H. Gaze, (1989). Mushrooms. Pest and Disease Control. *Intercept, Andover*.

Fontevedra Carreira, E., García Morrás, J.A., Gea Alegría, F.J., López Lorrio, A. y Millán carazo, C. (1995). Plagas y enfermedades de mayor importancia económica del champiñón. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid*, 15 pp.

García-Montero, L. G., Manjón, J. L., Pascual, C., y García-Abril, A. (2007). Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. *Forest ecology and management*, 242(2), 288-296.

García-Rollán, M. (1978). Plagas y enfermedades del champiñón y de las setas. *Ministerio de Agricultura. Madrid*. 28-58.

García-Rollán, M. (1982). Cultivo industrial de *Pleurotus ostreatus*. Hojas Divulgadoras Núm 11/82 HD. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid*. 16.

García-Rollán, M. (1985). Nuevas técnicas de cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Hojas Divulgadoras. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid*. 8, 85

García-Rollán, M. (1991). Cultivo de setas y trufas. *Ed. Mundi-Prensa. Madrid*. 174.

Gea, F.J. (2002). Plagas y enfermedades del género *Pleurotus* spp. In: Sánchez JE, Royse DJ (eds) La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Limusa, México. 205-224.

Gillespie, D. R., y Quiring, D. M. (1990). Biological control of fungus gnats, *Bradysia* spp. (Diptera: Sciaridae), and western flowers thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in greenhouse using a soil-dwelling predatory mite, *geolaelaps* sp. Nr. *Aculeifer* (Canestrini) (Acari: Laelapidae). *The Canadian Entomologist*, 122(05), 975-983.

Goldberg AA, Head S y Johnston P. (1965). Action of heat on pyrethrum extract: The isomerisation of pyrethrins to isopyrethrins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 16(1): 43 – 51

Hanski, I. (1981). Coexistence of competitors in patchy environment with and without predation. *Oikos*, 306-312.

Hanski, I. (1989). Fungivory: fungi, insects and ecology. *Insect-fungus interactions*, 25-68.

Hennings, P. (1991). *Fungi Indiae orientalis: I, II*. Berlin, Friedlander y Sohn. 269p.

Horn, H. y Macarthur, R. H. (1972). *Ecology* 53,749.

Jagdale, G. B., Casey, M. L., Cañas, L., y Grewal, P. S. (2007). Effect of entomopathogenic nematode species, split application and potting medium on the control of the fungus gnat, *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae), in the greenhouse at alternating cold and warm temperatures. *Biological Control*, 43(1), 23-30.

Jiménez-Ramírez, J.R. (2009). Conferencia sobre *Pleurotus eryngii*. Sociedad micológica de Madrid (on-line). Actualizada: 09/09/2004. [Fecha de consulta: 07/01/2012]. Disponible en: <http://www.socmicolmadrid.org/noti/noticias19.html>

Jonsell M. (2004). Host selection patterns in insects breeding in bracket fungi. *Ecological entomology*. 12-01;29:697-705.

Keates, S. E., Sturrock, R. N., y Sutherland, J. R. (1989). Populations of adult fungus gnats and shore flies in British Columbia container nurseries as related to nursery environment, and incidence of fungi on the insects. *New forests*, 3(1), 1-9.

Kim, H. H., Choo, H. Y., Kaya, H. K., Lee, D. W., Lee, S. M., y Jeon, H. Y. (2004). *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) as a biological control agent against the fungus gnat *Bradysia agrestis* (Diptera: Sciaridae) in propagation houses. *Biocontrol science and technology*, 14(2), 171-183.

Kjaerandsen, J. (1993). Diptera in mines and cave systems in southern Norway. *Entomologica Fennica*, 4, 151-160

Kjaerandsen, J. (2011) *Tarnania Fenestralis* General Description. Fungus Gnats (One-line). Actualizada: 02/05/2010. [Fecha de consulta: 05/09/2013]. Disponible en: <http://sciaroidea.info/>

Kjaerandsen, J. (2011) *Tarnania Fenestralis* Distribution área. Fungus Gnats (One-line). Actualizada: 02/05/2010. [Fecha de consulta: 05/09/2013]. Disponible en: <http://sciaroidea.info/>

Kjaerandsen, J. (2005). A review of fungus gnats in the tribe Exechiini (Diptera, Mycetophilidae) from the J.W.Zetterstedt collection at the Museum of Zoology in Lund, Swed. *Zootaxa*, 856, 1-35.

Kjaerandsen, J. (2006). Review of fungus gnats of the genus *Tarnania* Tuomikoski, with a phylogeny of the *Rymosia* s.l. genus group (Diptera: Mycetophilidae). *Insect System & Evolution*, 37, 217-228.

Kurina, O. (1994). New Records of Mycetophilidae (Diptera) reared from macrofungi in Estonia. *Proc. Estonian Academy of Science of Biology*, 43, 4, 216-220.

Levin, D. A., y Kerster, H. W. (1974). Gene flow in seed plants. *In Evolutionary biology*, Springer US, 139-220.

Llácer, E., de Altube, M. M., y Jacas, J. A. (2009). Evaluation of the efficacy of *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in *Phoenix canariensis*. *BioControl*, 54(4), 559-565.

Madwar, S. (1937). Biology and morphology of the immature stages of Mycetophilidae (Diptera, Nematocera). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 227(541), 1-110.

MAGMA. (2014). Registro de productos fitosanitarios (One-line). Actualizada: 01/03/2014. [Fecha de consulta: 13/03/2014]. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23586.Registro de productos fitosanitarios.pag. 030314-030325](http://www.magrama.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/23586.Registro%20de%20productos%20fitosanitarios.pag.030314-030325).

Mareggiani, G. (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60, 22 - 30.

Maroto Borrego, J. V. (1995). Horticultura herbácea especial. Actualizada: 09/06/2010. [Fecha de consulta: 07/01/2012]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006002506>

Martínez Peña, F. (2008). Producción de carpóforos de macromicetes epigeos en masas ordenadas de *Pinus Sylvestris* L. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I. de Montes, 53-59.

Martínez, F., Giner, M., y Lucas, J. A. (2003). Primeros resultados del estudio del aprovechamiento micológico a partir de encuestas en la zona MYAS (Soria): recolección, micoturismo y ordenación del recurso. In *Actas del I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada, Soria*, 15-20.

Matile, L. (1964). Diptère Fungivoridae récoltés dans l'île de Port-Cros (Var.).- *Cahiers des Naturalistes, Bulletin des Naturalistes Parisiens, nouvelle série* 20, 5-10.

Matile, L. (1970). Les Diptères cavernicoles. *Annales de Spéléologie*. Paris, Centre national de la recherche scientifique, 25, 179-222.

Martin, M.M., Kukor, J.J., Martin, J.S., O'Toole, T.E. y Johnson, M.W. (1981). Digestive enzymes of fungus-feeding beetles. *Physiological Zoology* 54, 137-145.

Mesler, M. R., Ackerman, J. D., y Lu, K. L. (1980). The effectiveness of fungus gnats as pollinators. *American Journal of Botany*, 564-567.

MBTOC. 2002. Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee Assessment. UNEP, Nairobi, Kenya, 354.

Navarro, T., de Lorenzo, C., Pérez, R.A. (2004). SPME analysis of volatile compounds from unfermented olives subjected to thermal treatment. *Anal Bioanal Chemistry*, 379:812-817.

Offner, R. (1929). Vaincre. Figuière, Baron, France, 235-240.

Orensanz García, J. V., y Navarro Virgos, C. (1979). Cultivo del *Pleurotus ostreatus* sobre madera. *Hojas Divulgadoras* (España), (3).

Ozores Hampton, M. Stansly P.A., McSorley, R. Obreza, T.A. (2005) Effects of long-term organic amendments and soil solarization on pepper and watermelon growth, yield, and soil fertility. *Hortscience* 40, 80-84.

Peck, S. B., y Russell, D. R. (1976). Life history of the fungus gnat *Macrocera nobilis* in American caves (Diptera: Mycetophilidae). *The Canadian Entomologist*, 108(11), 1235-1241.

Peñalver Hernándo, M. (2002). Memoria. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. *Universitat rovíra i virgili Departament de Química Analítica i Química Orgànica Àrea de Química Analítica*.18-51.

Pérez, R. A., Navarro, T., y Lorenzo, C. D. (2007). HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as a source of flavour in 'Campo Real'table olive preparations. *Flavour and fragrance journal*, 22(4), 265-273.

Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., y Tadeo, J. L. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2633-2637.

Poinar, Jr, G. O. (1991). The mycetophagous and entomophagous stages of *Iotonchius californicus* n. sp.-. *Revue Nématol*, 14(4), 565-580.

Poinar, G. O. (1992). *Steinernema feltiae* (Steinernematidae: Rhabditida) parasitizing adult fungus gnats (Mycetophilidae: Diptera) in California. *Fundamental and applied nematology*, 15(5), 427-430.

Ribeiro, E. (1990). Contribution to the study of fungus-gnats (Diptera: Mycetophiloidea) of Portugal. II- Seven new records. *Boletim Sociedade Portuguesa do Entomologia*, 4, 173-194.

Ribeiro, E., (1991). Contribution to the study of fungus-gnats (Diptera: Mycetophiloidea) of Portugal. IV- Three new records. *Boletim Sociedade Portuguesa do Entomologia*, 134, 2, 21-27.

Rimsaitė, J. (2000). Contribution to the knowledge of insects humifiers of fungi in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica* 10, 1, 95-99.

Rollán, M.G. (1989). Plagas y enfermedades del champiñón y las setas. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid*: 32-50

Russell Smith, A. (1979). A study of fungus flies (Dipteral Mycetophilidae) in beech woodland. *Ecological entomology*, 4(4), 355-364.

Señoráns, F.J. (2013). Nuevas técnicas de preparación de la muestra: MAE, ASE, SFE, SPE y SPME. *Área de Tecnología de Alimentos. Universidad*

Autónoma de Madrid (On-line). Actualizado: 01/03/2010. [Fecha de consulta: 15/12/2013]. Disponible en: <http://www.uam.es/otros/gruta/Research/Principal.htm>

Sevcik, J. (2001). A new species of Dynatosoma, fourteen new synonyms and other data on fungus gnats (Diptera: Mycetophilidae) from central and northern Europe *Studia dipterologica*, 8(1), 143-152.

Soli, G. E. E. (1994). Fungus gnats from Jostedal, West Norway (Diptera; Diadocidiidae and Mycetophilidae). *Fauna Norvegica*, Ser. B.9-10.

Slatkin, M. (1974). Competition and regional coexistence. *Ecology* 55, 128-134.

Tobar, V., Notario, A. Castresana, L. (2010). *Tarnania fenestralis* (Diptera: Micetophilidae) associated with *Pleurotus eryngii*. *Forest Systems* 19(3), 299-305

Tobar, V. (2008). Estudio de la entomofauna asociada a las setas silvestres: Etología y ecología del principal parásito de la seta de cardo (*Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué!l). *Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica, Madrid*, 97-200.

Tsuda, K., Futai, K., y Kosaka, H. (1996). The tripartite relationship in gill-knot disease of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. *Canadian journal of zoology*, 74(8), 1402-1408.

Tuomikoski R., 1996. Generic taxonomy of the Exechinii (Dipt., Mycetophilidae). *Annales Entomologici Fennici* 32, 159-194.

Weber, D., Zaenker, S., y Plassmann, E. 2007. Pilzmücken in Höhlen und künstlichen Hohlräumen. Ansfelden. *Entomofauna*, 28 (11), 125-140.

Yakovlev, E. B. (1994). Palaearctic Diptera associated with fungi and myxomycetes. *Karelian Research Centre RAS, Petrozavodsk (in Russian with English summary)*.

Zaitzev A.I., (2003). Fungus gnats (Diptera, Sciaroidea) of the fauna of Russia and adjacent regions. Part II. *An International Journal of Dipterological Research* 14, 77-386.

Capítulo 5. Conclusiones

Conclusiones.

Se asocia por primera vez *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) a *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. La Península Ibérica se encuentra dentro del área de distribución de la especie: Kjaerandsen, J. (2006) lo cataloga en España continental y Ribeiro, E. (1991) en la parte centro-este de Portugal, pero no se había asociado nunca el género *Tarnania* a este hongo hasta ahora.

Se describe por primera vez para la ciencia el ciclo biológico completo de *T.fenestralis*.

Todas las parasitaciones estudiadas sobre *Pleurotus eryngii* han resultado ser debidas a nematóceros de una misma familia (Diptera: Mycetophilidae), teniendo una representación muy destacada *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) y *Rymosia pseudocretensis* Burghel-Balacesco, 1967. Entre ellos *T. fenestralis* es claramente el más frecuente y el principal responsable de los daños producidos.

Se establece el nematócero fungívoro *T. fenestralis* como el principal y más importante parásito del hongo *P. eryngii* en la zona donde se realiza la investigación.

Se realiza la taxonomía y descripción de los adultos de *T.fenestralis* como de *R. pseudocretensis*, señalando las principales características de ambas especies con preparaciones alares y de genitales.

Se realiza descripción de los dos últimos estadios larvarios tanto de *T.fenestralis* como de *R.pseudocretensis*, ambas no descritas con anterioridad. Se llegan a identificar rasgos característicos de su estadio de desarrollo así como diferencias entre ambas especies.

Se demuestra una sincronización evolutiva entre el ciclo biológico de los carpóforos de *P.eryngii* y el ciclo del insecto (*T.fenestralis*) condición

fundamental para la supervivencia del insecto ya que los ciclos son muy cortos y se producen en condiciones ambientales muy especiales. Esto indica que el insecto está perfectamente adaptado evolutivamente en la parasitación (coevolución aparente) manteniendo así unos niveles de infestación razonables.

De esta manera las condiciones ambientales que retienen la evolución del carpóforo inhibirán la emergencia del insecto permaneciendo ambas en el terreno en espera de condiciones ambientales adecuadas para iniciar su ciclo.

El nivel detectado de daños permite seguir teniendo recolecciones naturales de seta de cardo y por tanto la perpetuación de las poblaciones del insecto. No obstante, estos niveles repercuten de forma importante en la calidad de las recolecciones por lo que es de interés desarrollar un método biológico de control que reduzca sus poblaciones. Con los datos expuestos anteriormente se ha ampliado los conocimientos sobre esta parasitación y nos ha permitido iniciar una nueva línea de investigación, sobre la que se trabaja actualmente, que trata de ejercer un control de las poblaciones parasitas en campo mediante el empleo atrayentes naturales implicados en el momento concreto de la puesta. Se presenta un protocolo ajustado de análisis de aromas por Micro-extracción en Fase Sólida.

Se desarrollan propuestas de control integrado. Como medida práctica se insta por una sencilla medida sanitaria: extraer del campo las setas agusanadas que se encuentren durante la recolección.

Se exponen las limitaciones a un control químico y se precisa un momento óptimo de aplicación según la fenología de las praderas y las dinámicas poblaciones del hongo y los parásitos.

La disminución en las poblaciones del parásito permitirá mejorar la calidad de las recolecciones naturales de la seta de cardo y no resultará en principio perjudicial para ellas ya que el interés principal que se atribuye a los insectos

parásitos de hongos epigeos, la ayuda a la dispersión, no parece producirse ya que en el momento de colocación de las puestas, las esporas se encuentran inmaduras y no se ha detectado en la etología del nematócero ningún comportamiento que implique un contacto con las láminas de los sombreros.

Se da cuenta que larvas de dípteros parásitos llegan a la cadena de consumo afectando a la mayoría de los consumidores, no siendo permitida esta contaminación por la normativa vigente. También se pone de manifiesto la dificultad que existe para localizar los carpóforos parasitados puesto que, la mayoría de los hongos, no sintomatizan externamente los daños. Las peculiaridades de la propia parasitación que se reflejan en este trabajo completan la dificultad para detectar carpóforos contaminados sin tener que seccionarlos, práctica que tampoco permite la legislación.

Se considera que la metodología utilizada en el estudio y manejo de parásitos de hongos epigeos en campo es una metodología de interés y aplicable a otros estudios similares.

Capítulo 6. Difusión de resultados

6.1. Publicaciones en revistas.

- ✚ Tobar, V., Notario, A., y Castresana, L. M. (2010). *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818)(Diptera: Mycetophilidae) associated with the fungus *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. *Forest Systems*, 19(3), 299-305.
Fecha de aceptación: 23 de marzo del 2010. Fecha de publicación: 10 de diciembre del 2010.

- ✚ Tobar, V., Notario, A., y Castresana, L. M. (2014). Description of the biological cycle of fungus gnats *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) (Diptera: Mycetophilidae) on the fungus *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. *Entomogica Fennica*.
Artículo en fase de revisión. Fecha de recepción: 27 de mayo del 2014.

6.2. Ponencias en congresos.

- ✚ Tobar, V., Notario, A., y Castresana, L. M.(2011). *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818), una nueva cita de díptero que parasita a la seta de cardo silvestre (*Pleurotus eryngii*) (DC.: Fr.) Quél. *VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada .XIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada. Baeza, 24 al 28 de octubre de 2011*.
Tipo de ponencia: Oral y Póster.
- ✚ Tobar, V., Notario, A., y Castresana, L. M.(2011). *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818), una nueva cita de díptero que parasita a la seta de cardo silvestre (*Pleurotus eryngii*) (DC.: Fr.) Quél. *Simposio Internacional de Gestión Forestal del Recurso Micológico. Centro de Investigación Forestal de Valonsadero de la Junta de Castilla y León. Valladolid, 9 al 11 de junio de 2011*.
Tipo de ponencia: Póster.

Capítulo 7. Anejos

7.1. Análisis de aromas por SMPE. Porcentajes y Diagramas de áreas de los analitos.

Area Percent Report

```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\1.D
Operator        : ARRABAL
Instrument       : 5890A
Sample Name     : A.
Run Time Bar Code:
Acquired on     : 05 Apr 11 02:50 AM
Report Created on: 07 Apr 11 09:53 AM

Page Number      : 1
Vial Number     : 1
Injection Number : 1
Sequence Line   : 1
Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Analysis Method  : ESENCIA3.MTH

```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\1.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	7.025	3850	255	BB	0.194	0.5828
2	8.352	75200	7320	BV	0.126	11.3835
3	8.542	81426	4684	VV	0.212	12.3260
4	9.512	26493	1689	VV	0.191	4.0104
5	10.292	67277	4980	VB	0.168	10.1842
6	13.074	3010	511	BV	0.089	0.4556
7	13.210	18224	1970	VB	0.122	2.7587
8	14.964	6365	726	BB	0.115	0.9635
9	15.593	1015	159	BB	0.080	0.1536
10	20.029	838	147	BB	0.081	0.1268
11	23.461	1181	245	BB	0.070	0.1788
12	30.795	625	151	BV	0.063	0.0946
13	30.983	1828	430	PB	0.068	0.2768
14	34.167	8603	1587	BV	0.083	1.3022
15	34.433	22912	1678	VV	0.181	3.4684
16	34.553	34668	1769	VB	0.241	5.2480
17	36.147	7046	232	BB	0.380	1.0666
18	36.681	677	145	BV	0.072	0.1025
19	37.152	5352	412	VB	0.169	0.8102
20	44.034	60469	2662	BV	0.288	9.1536
21	44.879	7467	1147	VB	0.098	1.1303
22	48.160	3041	503	BB	0.092	0.4604

Next page:

Tab.49. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo A. Informe de porcentaje de áreas resultante.

```

=====
                        Area Percent Report
=====
Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\1.D
Operator        : ARRABAL
Instrument       : 5890A
Sample Name     : A.
Run Time Bar Code:
Acquired on     : 05 Apr 11  02:50 AM
Report Created on: 07 Apr 11  09:53 AM
Page Number     : 1
Vial Number     : 1
Injection Number: 1
Sequence Line   : 1
Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Analysis Method  : ESENCIA3.MTH

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\1.D

```

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
---	-----	-----	-----	---	-----	-----
23	50.527	977	160	BB	0.093	0.1479
24	56.439	1752	240	BV	0.103	0.2653
25	56.918	191378	22323	VV	0.113	28.9701
26	57.728	28930	2552	VB	0.159	4.3794

```

Continuation:

Total area = 660606

```

Tab.49. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo A. Informe de porcentaje de áreas resultante. (Continuación)

Fig.87. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo A. Diagrama de de áreas resultante.

Area Percent Report

```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\2.D
Operator        : ARRABAL
Instrument       : 5890A
Sample Name     : B.
Run Time Bar Code:
Acquired on     : 05 Apr 11  01:24 AM
Report Created on: 07 Apr 11  09:54 AM

Page Number      : 1
Vial Number     : 2
Injection Number : 2
Sequence Line   : 2
Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Analysis Method  : ESENCIA3.MTH
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\2.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	8.307	75192	7437	BV	0.124	14.6493
2	8.508	66060	4142	VV	0.196	12.8701
3	9.488	16389	992	VV	0.199	3.1931
4	10.245	36598	3244	VB	0.136	7.1302
5	13.036	1667	297	BV	0.081	0.3248
6	13.172	9630	1176	VB	0.113	1.8761
7	14.912	3964	511	BB	0.109	0.7722
8	30.937	1504	348	BB	0.067	0.2929
9	34.550	26122	1429	BB	0.234	5.0892
10	36.080	3212	193	BB	0.218	0.6257
11	37.102	2511	268	BB	0.127	0.4892
12	44.579	11234	626	BV	0.225	2.1887
13	44.845	6545	840	VB	0.107	1.2751
14	48.120	1681	286	BB	0.086	0.3276
15	56.394	1237	166	BV	0.107	0.2411
16	56.831	138793	16948	PV	0.117	27.0404
17	57.864	110942	9817	VB	0.156	21.6143

Total area = 513282

Tab.50. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo B. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Fig.88. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo B. Diagrama de de áreas resultante.

Area Percent Report

```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\3.D
Operator        : ARRABAL
Instrument       : 5890A
Sample Name     : C.
Run Time Bar Code:
Acquired on     : 06 Apr 11 10:26 AM
Report Created on: 07 Apr 11 09:47 AM

Page Number      : 1
Vial Number     : 3
Injection Number : 3
Sequence Line   : 3
Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Analysis Method  : ESENCIA3.MTH
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\3.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	34.820	10099	1413	BB	0.102	7.3948
2	37.332	825	160	BB	0.072	0.6038
3	45.078	2281	105	BB	0.271	1.6703
4	45.421	1310	176	BB	0.105	0.9590
5	57.444	39030	3580	BV	0.152	28.5799
6	58.414	83021	8014	VB	0.151	60.7922

Total area = 136565

Tab.51. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo C. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Fig.89. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo C. Diagrama de de áreas resultante.

=====
 Area Percent Report
 =====

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\7.D
 Operator : ARRABAL Page Number : 1
 Instrument : 5890A Vial Number : 4
 Sample Name : D Injection Number : 4
 Run Time Bar Code: Sequence Line : 4
 Acquired on : 06 Apr 11 12:30 PM Instrument Method: ESENCIA3.MTH
 Report Created on: 07 Apr 11 02:00 AM Analysis Method : ESENCIA3.MTH

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\7.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
----	-----	-----	-----	----	-----	-----
1	6.969	12843	551	BB	0.286	3.1471
2	8.376	96263	6943	BV	0.168	23.5884
3	8.557	74657	5728	VV	0.217	18.2939
4	8.913	10843	2637	VV	0.069	2.6569
5	8.931	47311	2632	VV	0.300	11.5930
6	9.578	34668	1426	VV	0.290	8.4950
7	10.366	75177	3889	VB	0.230	18.4213
8	15.184	2682	256	BB	0.137	0.6573
9	31.302	3460	769	VB	0.068	0.8477
10	35.068	6356	414	BB	0.213	1.5576
11	38.169	891	207	BB	0.070	0.2184
12	57.310	22084	1520	BB	0.193	5.4114
13	58.775	20862	2006	BB	0.143	5.1119

Total area = 408096

=====
Tab.52. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo D. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Sig. 1 in C:\NCP\CHEM\1\DATA\SPME\7.D

Fig.90. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo D. Diagrama de de áreas resultante.

=====
Area Percent Report
=====

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\8.D
Operator : PAZ ANDRES Page Number : 1
Instrument : 5890A Vial Number : 5
Sample Name : E Injection Number : 5
Run Time Bar Code: Sequence Line : 5
Acquired on : 07 Apr 11 10:38 AM Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Report Created on: 07 Apr 11 01:13 PM Analysis Method : ESENCIA3.MTH

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\8.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
----	-----	-----	-----	----	-----	-----
1	2.433	206	969	BB	0.004	0.0535
2	8.353	34064	9174	BV	0.062	8.8551
3	8.372	59673	9126	VV	0.081	15.5119
4	8.572	83530	6178	VV	0.174	21.7136
5	9.534	30467	1925	VV	0.192	7.9199
6	10.322	9177	660	VV	0.168	2.3856
7	13.247	10591	1258	PB	0.115	2.7531
8	23.492	677	143	BB	0.068	0.1760
9	31.014	1960	451	PB	0.064	0.5095
10	34.371	2129	281	BV	0.095	0.5534
11	34.651	4051	605	VV	0.112	1.0530
12	34.687	4669	615	VV	0.093	1.2136
13	34.813	2899	470	VB	0.103	0.7536
14	36.229	2040	141	BB	0.179	0.5304
15	37.190	1465	217	BB	0.098	0.3808
16	38.505	726	145	BB	0.078	0.1886
17	44.941	2271	358	BB	0.093	0.5902

Next page
=====

continued

18	46.395	2530	101	BB	0.316	0.6576
19	48.211	1047	168	BB	0.096	0.2721
20	56.903	116905	12415	BB	0.124	30.3895
21	58.285	13614	940	BB	0.198	3.5389

Total area = 384689

=====

Tab.53. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo E. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Fig.91. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo E. Diagrama de de áreas resultante.

Area Percent Report

```

Data File Name   : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\9.D
Operator        : PAZ ANDRES
Instrument       : 5890A
Sample Name     : F.
Run Time Bar Code:
Acquired on     : 07 Apr 11 12:07 PM
Report Created on: 07 Apr 11 01:13 PM

Page Number      : 1
Vial Number     : 6
Injection Number : 6
Sequence Line   : 6
Instrument Method: ESENCIA3.MTH
Analysis Method  : ESENCIA3.MTH
  
```

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\9.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	8.311	98638	10712	BV	0.131	25.6365
2	8.523	62105	5237	VV	0.151	16.1414
3	8.885	20503	1258	VV	0.200	5.3287
4	9.502	18263	1194	VV	0.187	4.7466
5	10.269	4945	407	VB	0.163	1.2853
6	30.964	1343	311	BB	0.067	0.3491
7	34.747	5619	443	BB	0.189	1.4605
8	37.140	922	158	BB	0.087	0.2396
9	44.896	4844	346	BB	0.182	1.2589
10	56.833	92955	8455	BV	0.155	24.1595
11	57.903	74619	5391	VV	0.180	19.3938

Total area = 384758

Tab.54. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo F. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Fig.92. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo F. Diagrama de de áreas resultante.

Area Percent Report

Data File Name : C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\10.D
 Operator : PAZ ANDRES Page Number : 1
 Instrument : 5890A Vial Number : 6
 Sample Name : G.AIRE Injection Number : 6
 Run Time Bar Code: Sequence Line : 6
 Acquired on : 07 Apr 11 01:15 PM Instrument Method: ESENCIA3.MTH
 Report Created on: 07 Apr 11 02:21 PM Analysis Method : ESENCIA3.MTH

Sig. 1 in C:\HPCHEM\1\DATA\SPME\10.D

Pk#	Ret Time	Area	Height	Type	Width	Area %
1	34.785	735	105	BB	0.087	0.5652
2	56.826	50191	2990	BV	0.212	38.6079
3	57.534	855	277	VV	0.047	0.6578
4	57.807	77346	6279	VV	0.159	59.4959
5	58.561	875	108	VB	0.107	0.6731

Total area = 130002

Tab.55. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo G. Informe de porcentaje de áreas resultante.

Fig.93. Extracción de aromas. SMPE. Muestreo G. Diagrama de de áreas resultante.