

Universitat de Lleida



**Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària de Lleida**

**RESPUESTA DE ENCINAS TRUFERAS Y
MICELIO DE *TUBER MELANOSPORUM* A
VARIOS TRATAMIENTOS DE CONTROL
HERBÁCEO**

**PROYECTO FINAL DE CARRERA
INGENIERÍA DE MONTES**

Alumna: LORENA PALACIO MARTÍN

Tutor: CARLOS COLINAS GONZÁLEZ

Cotutor: ANTONI OLIVERA RUESTES

FEBRERO 2011

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 8 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 9 |
| Localización del estudio y características del hábitat..... | 9 |
| Antecedentes culturales de la plantación | 10 |
| Diseño experimental | 11 |
| Toma de datos:..... | 15 |
| - Suelo..... | 15 |
| - Recubrimiento herbáceo..... | 17 |
| - Diámetro y altura de las encinas..... | 17 |
| - Radiación fotosintéticamente activa (PAR) | 17 |
| Extracción de ADN..... | 17 |
| Cuantificación espectrofotométrica | 20 |
| PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)..... | 21 |
| Gel de electroforesis | 23 |
| Análisis de datos | 27 |
| RESULTADOS | 29 |
| Efecto de los tratamientos sobre la cubierta herbácea y la mortalidad..... | 29 |
| Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las encinas | 31 |
| Efecto de los tratamientos sobre la radiación fotosintéticamente activa reflejada desde el suelo | 34 |
| Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de micelio de <i>Tuber melanosporum</i> alrededor de los plantones | 35 |

| | |
|---------------------------------|----|
| DISCUSIÓN..... | 37 |
| CONCLUSIONES | 42 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

INTRODUCCIÓN

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) es un alimento de culto reconocido en todo el mundo como uno de los iconos de la gastronomía y cultura Europea (Murat y Martín, 2008). Las trufas son el cuerpo de fructificación (o ascocarpo) de un grupo de especies de hongos ascomicetes ectomicorrícicos pertenecientes al género *Tuber*, englobados en el orden de los Pezizales. Concretamente, la trufa negra es el cuerpo de fructificación del hongo *T. melanosporum*. Presenta un desarrollo hipogeo, lo que implica la producción de esporas en carpóforos subterráneos. Con esto el hongo es más resistente ante heladas o sequías, aunque también lleva a que carezca de mecanismos propios de dispersión de esporas. Son los animales quienes ejercen un papel fundamental en esta dispersión, pues el hongo desarrolla un olor muy característico que los atrae (De Miguel, 2000).

El carpóforo de la trufa negra está formado por la gleba, donde se encuentran las esporas, recubierta por una pared de color negro brillante llamada peridio. Posee forma globosa, algo irregular, con un tamaño que varía en función de las características climáticas del año y la época de recolección. Las ascas son globosas, en cuyo interior encierran de una a cuatro esporas opacas, de color marrón y con ornamentación (Estrada, 1987)

Como hongo ectomicorrícico, *T. melanosporum* forma asociaciones simbióticas con una serie de especies leñosas. Según la revisión efectuada en Colinas *et al.* (2007), son reconocidos simbiosomas de este hongo, encinas (*Quercus ilex* L. spp. *ilex*, *Q. ilex* L. spp. *ballota* (Desf.) Samp.), robles (*Q. faginea* Lam., *Q. pubescens* Mill.), coscojas (*Q. coccifera* L.), avellanos (*Corylus avellana*), jaras (*Cistus incanus*), pinos (*Pinus pinea* L., *P. halepensis* Mill., *P. nigra* Arnold), carpes negros (*Ostrya carpinifolia* Scop.), carpes o carpinos (*Carpinus betulus* L.), y tilos (*Tilia* sp.). Las especies de plantas huésped más habituales en las plantaciones son encinas y robles, y en menor medida, coscojas y avellanos (Samils *et al.*, 2008).

Dado que la trufa negra es un hongo apreciado y bien remunerado, la actividad recolectora por parte de especialistas es bien conocida en los encinares y robledales donde aparece. Sin embargo, en el último siglo, se ha constatado una disminución de la producción silvestre, achacada principalmente al progresivo abandono de los

montes, que ha causado un aumento de la espesura, dificultando la supervivencia del hongo; además de una recolección excesiva de trufa, que impide la correcta dispersión de las esporas (Reyna, 2007). Esto, junto al elevado precio en el mercado de la trufa (371 €/kg en la temporada 2009-2010; 429 €/kg durante el período 1999-2010), el apoyo y divulgación por parte de asociaciones truferas y administración, y la abundante oferta de plantones inoculados con el hongo productor de la trufa negra, ha hecho que la superficie ocupada por nuevas plantaciones para la producción de este hongo haya aumentado de manera notable, a un ritmo de 50.000 plantas anuales (Reyna, 2007)

En una hectárea de una plantación trufera, la producción media ronda los 10 a 50 kg anuales, con un beneficio estimado de 2.697 €/ha/año (Oliach *et al.*, 2008). Este es el principal motivo por el que este tipo de plantaciones se están convirtiendo en una alternativa rentable en zonas con unas características consideradas aptas para su cultivo, bien como una actividad complementaria a los cultivos agrícolas tradicionales, o como la sustitución de estos.

El período comprendido entre la plantación y la entrada en producción varía entre los 5 y los 8 años, aunque en ocasiones puede incluso prolongarse (De Miguel y Saez, 1997), o darse el caso de que algunos árboles ni siquiera lleguen a producir trufa negra. Entre las causas que pueden llevar a la no-producción de algunos árboles, destacan la mala calidad de los plantones inoculados, presentado estos escasa o nula presencia de *T. melanosporum* en sus raíces, y el establecimiento en parcelas con condiciones para el cultivo de la trufa alejadas de las adecuadas, limitando el desarrollo del hongo.

Un buen indicador del correcto desarrollo del hongo, es la aparición del quemado alrededor del árbol entre el cuarto y el séptimo año de la plantación (Colinas *et al.*, 2007). Estos quemados son zonas desprovistas de vegetación debido al efecto alelopático que tiene el micelio del hongo, y que inhibe la germinación de otras especies (Fasolo Bonfante *et al.*, 1971; Estrada, 1987), con una forma más o menos circular alrededor del tronco, y un crecimiento aproximado hacia el exterior de entre 10 y 20 cm anuales (García-Montero *et al.*, 2007). Según el mismo autor, el tamaño del quemado está relacionado positivamente con la producción de trufas. Pero la aparición del quemado no garantiza producción de trufas, y su ausencia la no-

producción. Hay árboles que producen trufa sin mostrar signos de quemado (frecuente en suelos arenosos), mientras que otros que sí tienen quemado no producen. Además, existen otros hongos micorrícicos que desarrollan quemados, aunque no tan desprovistos de vegetación. A pesar de esto, lo más frecuente es que se den trufas en las zonas de quemado.

Las causas por las que el hongo necesita más o menos tiempo para alcanzar la fase productiva no están claras, aunque existe un acuerdo general en que los antecedentes culturales, las condiciones edafológicas y climáticas, y el manejo de la plantación son factores clave en este aspecto.

Los antecedentes culturales para el establecimiento de plantaciones truferas son tenidos en cuenta debido a la carga de inóculo de hongos ectomicorrícicos susceptibles de competir con *T. melanosporum*, y la presencia de ciertas especies leñosas (Ricard *et al.*, 2003). Generalmente, los campos dedicados al cultivo de cereal durante varios años presentan un bajo nivel de inóculo de hongos ectomicorrícicos. En la actualidad, la introducción de *T. melanosporum* se realiza a través de plantas huésped con abundantes micorizas de dicho hongo. A partir del manto de las micorizas emanan un conjunto de células especializadas que se conocen como cistidios o espínulas (Reyna, 2007). Además, el manto también está conectado con el micelio extramatricial más o menos desarrollado, que se extiende desde la raíz hacia el suelo, y que juega un papel importante en la absorción de nutrientes y agua (Zampieri *et al.*, 2010). Dicho micelio puede llegar a formar una fracción significativa de la biomasa total del suelo, tanto que en los bosques templados se ha estimado una cantidad de 700 a 900 kg/ha de micelio y raíces micorizadas (Wallander *et al.*, 2001).

El micelio extramatricial de los hongos ectomicorrícicos puede alcanzar grandes distancias desde las raíces colonizadas. En el caso de *Tuber magnatum*, se ha detectado la presencia de su micelio a 100 metros del árbol productivo más próximo (Zampieri *et al.*, 2010). Por otro lado, Suz *et al.* (2008) detectaron cantidades de micelio de *T. melanosporum* tanto en árboles productivos como en no productivos. Estos autores sugieren que es necesaria una cierta cantidad de biomasa de micelio para que el hongo tenga la capacidad de desarrollar la actividad fitotóxica que produce el quemado, o producir un cambio que implique el paso de crecimiento

vegetativo a producción de carpóforos. Suz *et al.* (2006) afirman que el quemado no coincide con la distribución del micelio, ya que hallaron presencia de éste fuera del área del quemado.

El manejo de la cubierta herbácea puede ser un factor relevante para la supervivencia y desarrollo de *Q. ilex* en los primeros estadios del establecimiento de las plantaciones (Sánchez-Andrés *et al.* 2006; Bonet *et al.* 2006), así como en *Q. faginea* (Rey Benayas *et al.*, 2003). En condiciones de manejo extensivo, a mayor intensidad de control herbáceo, mayor fue la abundancia de micorrizas de *T. melanosporum* en encinas de cuatro años en campo, observándose una buena correlación entre la biomasa de las encinas y la abundancia de micorrizas (Olivera, 2005).

Actualmente, son muchas las técnicas utilizadas para la gestión de la cubierta herbácea. Dado que la tendencia es a reducir los "inputs" en la agricultura, se buscan sistemas de manejo de la cubierta herbácea alternativos al uso de herbicidas. Estos consisten en métodos pasivos, como es el acolchado, bien sintético o natural; y en métodos dinámicos, como es el desherbado, manual o mecánico. Existe en el mercado un amplio abanico de acolchados sintéticos, plásticos de polipropileno de diversos colores y espesores, así como una serie de cubiertas naturales usadas tradicionalmente: astillas de madera, piedras, paja o heno. Para llevar a cabo el desherbado mecánico se realizan pases con cultivador o bien una escarda manual (Merwin *et al.*, 1995).

Uno de los objetivos principales que se presentan para la utilización de acolchados es reducir la pérdida de suelo o erosión a causa del agua, sobre todo en zonas con condiciones semi-áridas. Se ha demostrado su efectividad para este fin, aunque existen variaciones en función de la pendiente, la textura del suelo, y el tipo de acolchado (Smets *et al.*, 2008). Además, los acolchados disminuyen la densidad aparente del suelo y la escorrentía, y aumentan la estabilidad de los agregados, la capacidad de agua disponible, el contenido de materia orgánica (dependiendo del tipo de acolchado), y la porosidad, este último muy importante ya que ayuda a renovar la atmósfera del suelo y esto hace que estimule el crecimiento de las raíces, con lo que se consigue una mayor absorción de agua y nutrientes (Jordán *et al.*, 2010) Si se utilizan acolchados orgánicos, se puede aumentar la actividad

microbiana debido a la descomposición de los aportes, que incluso puede ser aprovechado a corto plazo por las plantas como fuente de nutrientes (García-Orenes *et al.*, 2010).

Por otro lado, el arado disminuye la estabilidad de los agregados, ya que se rompe su estructura, y aumenta la erosionabilidad, en parte porque se elimina la vegetación (García-Orenes *et al.*, 2009)

Estudios realizados sobre el crecimiento de la encina por Jiménez *et al.* (2007) han puesto de manifiesto que el agua es el factor más determinante en el crecimiento de la especie, y con una mayor protección ante la evapotranspiración, la disponibilidad de nutrientes es mayor, así como su efectividad. Para este fin, han determinado que la colocación de piedras a modo de acolchado alrededor del tronco es un buen tratamiento que puede favorecer el desarrollo de las encinas, ya que se reduce la evapotranspiración. Otros estudios que atienden al desarrollo de los árboles, como el de Truax y Gagnon (1993), utilizan plásticos de color negro en varias especies, entre ellos el *Quercus macrocarpa*, con los que han comprobado que aumenta la temperatura, debido a las propiedades de transmisión del calor, lo que hace a su vez que aumente la mineralización de nitrógeno. Con este plástico se evita el lavado de nutrientes y aumenta la humedad respecto al control, aunque los efectos en la supervivencia no han sido destacados. También Chaar *et al.* (2008) utiliza malla negra como acolchado en *Q. suber*, determinando que se favorece ligeramente el crecimiento en altura, pero presentan el problema de la escasa duración a la intemperie.

En truficultura se han utilizado tradicionalmente los acolchados con el fin de recubrir el suelo para conservar la humedad el máximo tiempo posible (Reyna, 2007; Giraud y Verlhac, 1987). En general, los beneficios de los acolchados en truficultura pueden resumirse en que inhiben la germinación de plantas, reducen la evaporación de agua del suelo, mejoran la infiltración, mantienen la humedad del suelo, aumentan la actividad biológica, y mantienen temperaturas más frescas en verano, protegiendo contra las heladas en invierno (Etayo *et al.*, 2001). El desherbado con acolchados también ha mostrado buenos resultados en la respuesta productiva (Ciani *et al.*, 1988). Sin embargo, éstos pueden afectar al balance entre el hongo de interés productor de trufa y los hongos competidores en los primeros años

de establecimiento de la plantación, lo que sugiere que podrían influir en la producción de trufa (Zambonelli *et al.*, 2005).

La escarda manual es una práctica aconsejada en las plantaciones truferas durante los primeros años. Se trata de realizar una escarda poco profunda con azada alrededor de la planta. Su finalidad está en evitar la competencia de malas hierbas, y retener mayor humedad (Reyna, 2007), lo cual parece ser relevante para la supervivencia de las encinas y la proliferación del micelio del hongo a través del suelo (Oliach *et al.*, 2008). La escarda manual puede ser complementada con pases de cultivador sin aproximarse excesivamente a los pequeños árboles.

Entre los truferos, existe la práctica de colocar piedras para proteger el quemado, lo que puede actuar como acolchado (Reyna, 2007). La existencia de pedregosidad superficial regula la temperatura del suelo y favorece la condensación y la humedad, mientras que bajo la superficie disminuye el volumen de tierra fina, aumentando así la humedad. Esta pedregosidad superficial está relacionada con la productividad, y puede explicar el 24% de la variabilidad de producción de carpóforos (García Montero *et al.*, 2007).

Dado el largo período de tiempo comprendido entre el establecimiento de la plantación trufera y la obtención de las primeras trufas, es importante conocer el estado de desarrollo de *T. melanosporum* y confirmar su presencia a lo largo de los años. Para esto, se ha venido realizando la observación de las micorrizas existentes en el sistema radicular de los árboles huésped. Para este fin, en plantaciones jóvenes, de hasta cuatro años de edad, es posible extraer la totalidad del sistema radicular y cuantificar las micorrizas (Bonet *et al.*, 2006). A pesar de que los datos resultantes son una fiel representación de la realidad, la técnica resulta ser muy costosa y destructiva, no permitiendo un posterior análisis del estado de micorrización en el tiempo, además de estar limitada a un cierto grado de desarrollo del árbol. Por esto, se realizan muestreos parciales del sistema radicular de los huéspedes, consistentes en la recogida de una parte de los ápices tróficos. Dado que la distribución de muchas especies micorrícicas no es homogénea, el fenómeno de agrupamiento de las micorrizas en el suelo dificulta la interpretación de los datos procedentes de muestreos parciales, lo cual añade muchas dudas sobre la bondad de dichos muestreos (Taylor, 2002).

Recientemente se está llevando a cabo el uso de técnicas moleculares para la identificación y cuantificación del micelio de los hongos presentes en el suelo. Este tipo de técnicas presentan la ventaja de ser mucho menos destructivas que la extracción de micorrizas. Así como las micorrizas de *T. melanosporum* pueden identificarse fácilmente con medios ópticos, no ocurre lo mismo con el cuerpo miceliar. La identificación de las especies ectomicorrícicas se basa en la extracción de pequeñas cantidades de ADN del suelo, y la posterior amplificación de regiones específicas deseadas. Para esto se utilizan cebadores específicos para cada hongo, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Si bien la PCR convencional es una herramienta muy potente para la amplificación de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, en los últimos años se han ido desarrollando un conjunto de técnicas para la cuantificación del ADN presente en las muestras, que presentan aplicaciones diversas según objetivos y el grado de precisión deseado. Según autores como Raeymaekers (2000), la PCR convencional más la utilización de un estándar, esto es, una serie de muestras con cantidades iniciales conocidas de ADN, permite estimar el número inicial de copias del fragmento de ADN de la muestra mediante comparación, tanto en la fase lineal como de saturación. La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante de esta técnica, con la que es posible amplificar y cuantificar simultáneamente el producto de la amplificación del ADN. Para ello se realizan mediciones una vez finalizado cada ciclo, no siendo necesarios los pasos posteriores de análisis mediante gel, reduciendo en parte posibles contaminaciones externas, lo que permite la obtención de los datos de forma inmediata. Un estudio sobre la abundancia de micelio de *T. melanosporum* realizado por Suz *et al.* (2008), determina que no hay diferencias significativas entre los resultados proporcionados por ambas técnicas en la cuantificación de micelio de *T. melanosporum*, lo que hace recomendable el uso de la PCR convencional con estándares por su menor coste.

OBJETIVOS

Dada la importancia de la competencia herbácea sobre el desarrollo de las jóvenes encinas truferas, y las sugerencias de que algunos tratamientos de control herbáceo pudieran afectar al desarrollo extramiceliar de *T. melanosporum*, este proyecto plantea el objetivo general de conocer la respuesta de las encinas y del micelio de *T. melanosporum* a diversos métodos de control herbáceo. Los objetivos concretos son:

1) conocer el efecto de ocho tratamientos de control herbáceo sobre la cubierta herbácea;

2) conocer el efecto de ocho tratamientos de control herbáceo sobre la supervivencia y crecimiento de las encinas truferas;

3) estudiar la radiación fotosintéticamente activa reflejada por el suelo sometido a ocho tratamientos de control herbáceo;

4) conocer el efecto de ocho tratamientos de control herbáceo sobre la cantidad y distribución del micelio de *T. melanosporum* alrededor de las encinas truferas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del estudio y características del hábitat

La parcela de estudio se localiza en el noroeste del término municipal de Tremp, comarca del Pallars Jussà (Lleida), a una altitud de 830 metros. La superficie arable es de 1,16 ha y la pendiente del 11,3%.

La zona forma parte de la unidad geomorfológica sur-pirenaica central, formada por materiales geológicos de origen sedimentario, especialmente calcáreos (Conesa, 2001).

El clima es mediterráneo continental con veranos secos y calurosos e inviernos fríos (Conesa, 2001). La pluviometría media anual es de 725 mm. La temperatura media del mes más cálido ronda los 22°C, y la mínima los 4°C, siendo la media anual 12°C (Plana, 1985).

La vegetación que rodea la parcela de estudio está formada por cultivos tradicionales de cereal, y por el bosque de carrasca (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) y roble pubescente (*Quercus pubescens* Willd.).



Fotografía 1. Vista general de la parcela de estudio y alrededores.

La textura del suelo es franco-arenosa. El resto de propiedades químicas aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de suelo de la parcela del estudio.

| Parámetro | Valor |
|---------------------------------------|----------------|
| pH al agua sups 1:2,5 | 8,3 |
| Cond. electrica 25 °C (Pr.Pre) (dS/m) | 0,17 |
| Mat. organica oxidable (%) | 3,53 |
| Nitrogeno Kjeldahl (N) (%) | 0,17 |
| Fósforo (P) Asimilable (Olsen) (ppm) | 11 |
| Potasio (K) (Ex. ac. am.) (ppm) | 112 |
| Magnesio (Mg) Ex. ac. am) (ppm) | 64 |
| Calcio (Ca) (Ex. ac. am.) (ppm) | 7.073 |
| Sodio (Na) (Ex. ac. am.) (ppm) | 32 |
| Carbonato Calcico equivalente (%) | 41 |
| Arena total 0,05<d<2 mm (%) | 51,9 |
| Limo grueso 0,02<d<0,05 (%) | 13,1 |
| Limo fino 0,002<d<0,02 (%) | 17,7 |
| Arcilla d<0,002 (%) | 17,3 |
| Clase textural USDA | Franco-Arenosa |

Antecedentes culturales de la plantación

Durante varios años la parcela, cuya superficie es 11.620 m², estuvo dedicada a la producción forrajera y de cereal con algunos años de barbecho. En la primavera del 2007, después de un subsolado profundo y varios pases de cultivador se plantaron encinas inoculadas con *T. melanosporum*. Los plantones de una savia procedían de un vivero especializado en la producción de planta inoculada. El estado de colonización de las raíces por parte de *T. melanosporum* se encontraba entre el 38% y el 67%, y no se encontró ninguna micorriza de otros hongos diferentes a este (Datos facilitados por el propietario, procedentes del servicio de evaluación de planta del Área de Defensa del Bosque-CTFC).

Diseño experimental

El diseño experimental para este estudio fue un unifactorial completamente aleatorizado. El factor considerado fue el control herbáceo, con ocho niveles o tratamientos. El marco de plantación de la parcela fue de 6 x 6 m. Las filas dedicadas a este estudio contenían una planta adicional, por lo que el marco fue de 6 x 3 m. Los tratamientos se aplicaron a dos plantas seguidas que fueron consideradas una única unidad experimental. Los parámetros de estudio se obtuvieron mediante la media de las dos plantas. Todos los tratamientos se realizaron en un cuadro de 4 m² alrededor de la planta, excepto los pases de cultivador, que abarcaron toda la superficie entre plantas. Los tratamientos fueron:

- Malla blanca doble: Dos capas de malla tipo HORSOL[®] BLANCO (Projar S.A, Valencia), un geotextil tejido con cintas de polipropileno, con un gramaje de 110 gr/m², y una superficie de 2x2 m.



Fotografía 2. Tratamiento de malla blanca doble.

- Malla blanca simple: Una capa de malla tipo HORSOL® BLANCO, con un gramaje de 110 gr/m², y una superficie de 2x2 m.



Fotografía 3. Tratamiento de malla blanca simple.

- Laboreo mecánico: Pases con el cultivador hasta una profundidad máxima de 10 cm en las proximidades de la planta.



Fotografía 4. Tratamiento de laboreo mecánico.

- Escarda manual: Eliminación de la cubierta herbácea con una azada, hasta una profundidad de 10 cm.



Fotografía 5. Tratamiento de escarda manual.

- Malla negra doble: Dos capas de malla tipo HORSOL[®] NEGRO (Projar S.A., Valencia), un geotextil tejido con cintas de polipropileno, con un gramaje de 105 gr/m², y una superficie de 2x2 m.



Fotografía 6. Tratamiento de malla negra doble.

- Malla negra simple: Una capa de malla tipo HORSOL[®] NEGRO, con un gramaje de 110 gr/m², y una superficie de 2x2 m.



Fotografía 7. Tratamiento de malla negra simple.

- Cubierta de piedra: Capa de entre 8 y 10 cm de grosor de piedra blanca calcárea, de diámetros comprendidos entre los 3 y los 6 cm.



Fotografía 8. Tratamiento de cubierta de piedra.

- Testigo: Tratamiento control sobre el que no se realizó ninguna actuación.



Fotografía 9. Tratamiento control.

Todos los tratamientos con mallas y cubierta de piedra quedaron instalados al cabo de dos meses después de plantación. Los tratamientos mecánicos se realizaron dos veces cada año, uno en abril-mayo y otro en setiembre-octubre.

Toma de datos:

- Suelo

La toma de muestras de suelo para la extracción de ADN se llevó a cabo en un período de dos semanas durante el mes de diciembre de 2009 en un total de 64 árboles, 8 repeticiones de cada tratamiento. En este muestreo, uno de los dos árboles de cada unidad experimental fue escogido al azar y el sistema suelo-árbol fue considerado como unidad experimental. En cada unidad se tomaron dos submuestras, una a 15 cm del tronco del árbol y la otra a 30 cm. Se retiraron los primeros 5 cm de suelo, con lo que se recolectó a una profundidad entre 5 y 20 cm, utilizando una barrena de 7 cm de diámetro. Se tomó esta profundidad ya que se ha observado que el micelio de *T. melanosporum* es más abundante en los 35 primeros centímetros de suelo (Suz *et al.*, 2006).



Fotografías 10 y 11. Toma de muestras de suelo a 15 y 30 cm desde el tronco del árbol.

Durante la primera fase de muestreo también se tomaron muestras a las distancias de 45 y 60 cm del tronco de las encinas. Estas muestras no rindieron DNA de *T. melanosporum*, por lo que se desestimó seguir con la toma de muestras a dichas distancias.

La intensidad de muestreo en cada distancia se mantuvo proporcional a la circunferencia alrededor de la planta, de modo que a 15 cm se tomaron 4 muestras en posiciones opuestas, y a 30 cm se recolectaron 8 muestras equidistantes. El suelo recogido para cada distancia se cribó con una luz de 2 mm en campo y mezcló, considerando cada distancia una única muestra.



Fotografías 12 y 13. Criba de muestras de suelo.

Con esto, se recogieron un total de 128 muestras de suelo de la parcela, que fueron debidamente etiquetadas con el número de árbol (unidad experimental) y la distancia, mantenidas en frío en la fase de campo y una vez en laboratorio, congeladas a -20°C hasta su posterior análisis.



Fotografía 14. Etiquetado y conservación en frío de las muestras en campo.

- Recubrimiento herbáceo

Al final de cada periodo de crecimiento de las encinas, en junio y diciembre, se estimó el porcentaje de recubrimiento herbáceo de 111 plantas. El total de observaciones a lo largo de los dos años y medio de experiencia fue de cinco.

- Diámetro y altura de las encinas

Al final del periodo de crecimiento otoñal se midió el diámetro en la base de 90 encinas sobre marcas realizadas anteriormente con pintura blanca. Para ello se utilizó un pie de rey electrónico. También se midieron las alturas con cinta métrica metálica a partir de la marca blanca.

- Radiación fotosintéticamente activa (PAR)

En diciembre de 2009 se tomo la PAR incidente y reflejada en 111 unidades experimentales mediante el ceptómetro ACCUPAR LP-80 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EEUU). A partir de estas medidas se calculó el porcentaje de PAR reflejado para cada punto de observación como el cociente entre la radiación reflejada y radiación incidente, multiplicado por 100.

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de las 128 muestras de suelo utilizando el "PowerSoil[®] DNA Isolation Kit" (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EEUU). Se siguió el protocolo indicado, aumentando la cantidad inicial de suelo empleada a 0,50 gramos de suelo por muestra.

Este protocolo se detalla a continuación, junto con una breve descripción de cada paso.

1. Añadir 0,50 gramos de suelo a los tubos "PowerBead". A partir de aquí comienza un proceso de homogeneización y lisis. Estos tubos contienen un tampón que actúa ayudando a dispersar las partículas de suelo, comienza con la disolución de los ácidos húmicos, y protege los ácidos nucleicos de la degradación.
2. Agitar. Con esto se mezclan los componentes y se dispersa la muestra en la solución "PowerBead".
3. Añadir 60 µl de la Solución C1 y agitar para mezclar. Esta solución contiene SDS y otros agentes de interrupción necesarios para completar la lisis celular. El SDS es un detergente aniónico que rompe los ácidos pesados y los lípidos asociados a la membrana celular de muchos organismos.
4. Agitar las muestras en posición horizontal durante 10 minutos. Este paso es muy importante para completar la homogeneización y la lisis celular. La lisis se produce por una combinación de agentes químicos (pasos 1 a 3) y este agitado mecánico. Mediante la sacudida al azar de las pequeñas piedras que contienen los tubos, se producen colisiones que hacen que las células se rompan.
5. Centrifugar los tubos "PowerBead" a 10.000 g durante 30 segundos.
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Se obtiene entre 400 y 500 µl, que todavía contiene partículas de suelo.
7. Añadir 250 µl de la Solución C2, agitar durante 5 segundos e incubar a 4°C durante 5 minutos. La solución C2 contiene un reactivo para precipitar las sustancias húmicas, restos de células, y proteínas. Es importante eliminar la materia orgánica e inorgánica que puede reducir la pureza del ADN.
8. Centrifugar los tubos a 10.000 g durante 1 minuto.

9. Transferir 600 μl del sobrenadante a un nuevo tubo, evitando el precipitado. En el precipitado se encuentran las sustancias húmicas, restos de células, y proteínas.
10. Añadir 200 μl de la Solución C3, agitar brevemente e incubar a 4°C durante 5 minutos. La solución C3 es un segundo reactivo para precipitar las sustancias no deseadas que todavía pudieran mantenerse en la muestra.
11. Centrifugar los tubos a 10.000 g durante 1 minuto.
12. Transferir 750 μl del sobrenadante a un nuevo tubo.
13. Añadir 1,2 ml de la Solución C4 al sobrenadante y agitar durante 5 segundos. La solución C4 tiene una alta concentración de sales, que permite la unión del ADN a la sílice, pero no del material inorgánico que todavía está presente en niveles bajos.
14. Transferir el líquido a un filtro de centrifugación y centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto. Este dispositivo tiene una membrana silíceas, que en altas concentraciones de sales, retiene el ADN y deja pasar los contaminantes.
15. Añadir 500 μl de la Solución C5 y centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos. La solución C5 tiene una base de etanol que permite lavar el ADN situado en el filtro de la membrana de sílice del filtro de centrifugación. Con esto se eliminan los residuos de la solución salina, ácidos húmicos, y otros contaminantes, manteniendo el ADN en la membrana.
16. Descartar el flujo sobrante. Aquí es donde se encuentran los restos que se han lavado con el etanol.
17. Centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto. Con esto se eliminan los residuos de etanol.
18. Colocar el filtro de centrifugación en un nuevo tubo colector.
19. Añadir 100 μl de la Solución C6 sobre la membrana. La solución C6 es una sustancia tampón que pasa a través de la membrana, y que libera el ADN unido anteriormente a esta.

20. Centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos.
21. Descartar el filtro de centrifugación. El ADN se encuentra ya en el tubo para ser utilizado.

Una vez extraído el ADN de cada muestra, diluido en 100 μ l, se diluyó de nuevo a 1/10, lo que equivale a una dilución del precipitado de ADN original en 1000 μ l. La cantidad de disolución utilizada en la amplificación fue de 5 μ l. Todas las muestras se conservaron en el congelador a una temperatura de -20°C hasta su posterior utilización.

Cuantificación espectrofotométrica

El contenido de ADN de las 128 muestras extraídas se cuantificó espectrofotométricamente mediante el NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU). La espectrofotometría se basa en el hecho de que existe una relación entre la absorción de luz ultravioleta por el ADN y su concentración en la muestra. Es posible conocer el grado de pureza de los ácidos nucleicos examinando la absorción en diferentes longitudes de onda. El ADN presenta su máximo de absorción a 260 nm, las proteínas a 280 nm, y los polisacáridos a 230 nm (Heptinstal y Rapley, 2000). A partir de 1 μ l de muestra, se obtuvieron los resultados de cantidad de ADN, y se evaluaron los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230. Para este caso, en suelo, el ratio entre 260 nm y 280 nm debe tomar valores próximos a 2. El ratio entre 260 nm y 230 nm es una segunda medida de la pureza de los ácidos nucleicos que suele tomar valores aproximados de 1,5. Si estos valores son inferiores, pueden indicar la presencia de proteínas, fenol, u otros contaminantes en la muestra, aunque el proceso de amplificación está más influido por el ratio A_{260}/A_{280} (Krsek y Wellington, 1999).

Todas las muestras presentaron cantidades de ADN comprendidas entre 6 y 37 ng/ μ l. A modo de ejemplo, se muestran los ratios obtenidos para dos de las muestras (Tabla 2), así como sus curvas de absorbancia (Figura 1).

Tabla 2. Ratios de absorbancia y cantidad de ADN.

| Muestra | Ratios de absorbancia | | ng/ μ l |
|---------|-----------------------|---------|-------------|
| | 260/280 | 260/230 | |
| 86.30 | 2,02 | 1,55 | 17,31 |
| 152.15 | 2,06 | 1,44 | 20,21 |

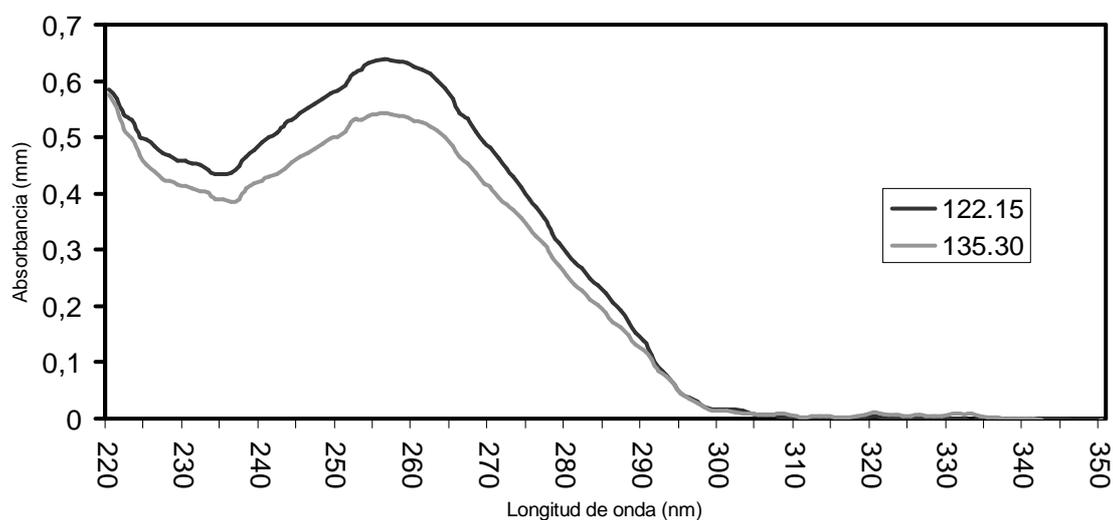


Figura 1. Curvas de absorbancia de dos muestras de ADN extraído a partir de las muestras de suelo.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para la amplificación de las muestras se utilizó el kit “illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads” (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Este kit contiene BSA, dATP, dCTP, dGTP y dTTP en una concentración de 200 μ M, 2,5 unidades de puReTaq DNA polimerasa, tampón de reacción 10 mM Tris-HCl (pH 9 a temperatura ambiente), 50 mM de KCl, y 1,5 mM de MgCl₂. El volumen final de la amplificación fue de 25 μ l, añadiendo 5 μ l de la muestra de ADN, 18 μ l de agua estéril Milli-Q, y 1 μ l de cada iniciador a 10 mM. Los iniciadores utilizados fueron ITSML/ITS4LNG (Paolucci *et al.*, 2000):

ITSML= 5’-TGGCCATGTGTCAGATTTAGTA-3’,

ITS4LNG= 5’-TGATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3’

Las muestras se colocaron en un termociclador (Biometra, Goettingen, Alemania), siguiendo el programa de ciclos propuesto por Paolucci *et al.* (1997, 2000) y Gandeboeuf *et al.* (1997), al que se le introdujeron modificaciones para adaptarlo a las necesidades del estudio. El programa para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue el siguiente:

1. 94°C 5'
2. 94°C 30''
3. 54°C 30''
4. 72°C 1' Del punto 2 al 4, 5 ciclos.
5. 94°C 30''
6. 48°C 30''
7. 72°C 1' Del punto 5 al 7, 33 ciclos.
8. 72°C 10'.
9. 4°C Pausa

Este proceso tiene tres pasos principales consistentes en cambios de temperatura de calor y frío en cortos periodos de tiempo, que se repiten constantemente durante varios ciclos. Con esto se consigue un gran número de copias de la región de ADN seleccionada.

1. Desnaturalización a 94°: Durante la desnaturalización la doble hélice de ADN se separa en dos cadenas simples, debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno que provocan las altas temperaturas.
2. Hibridación a aproximadamente 50°: La disminución de la temperatura permite que los iniciadores se unan a las secuencias de ADN que se quiere amplificar.
3. Extensión a 72°: Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del iniciador utilizando como molde la

cadena de ADN que se ha desnaturalizado. Es a esta temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad.

Todas las muestras se guardaron en el congelador a -20°C para su posterior utilización.

Gel de electroforesis

Las muestras resultado de la amplificación fueron analizadas en geles de electroforesis al 1% de agarosa (Agarose MS-8., Pronadisa, Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz-Madrid), con una cantidad de 80 ml de 1xTBE, 0,8 g de agarosa, y 2 µl de bromuro de etidio (BrEt) en cada gel. Se utilizó un sistema de gel horizontal (VWR-AGT1, West Chester, Pensilvania, EEUU), con una fuente de alimentación para electroforesis Consort, modelo EV243 (Turnhout, Bélgica), que trabajó a 70V, 300 mA y 50 W durante 40 minutos.

Se utilizaron peines de 20 pocillos para tener en un mismo gel ocho muestras de suelo, todas pertenecientes a la misma distancia, pero de los ocho tratamientos existentes, esto es, una de cada tratamiento. En los geles se colocó un control positivo procedente de carpóforo de *T. melanosporum*, un control negativo consistente en una extracción de suelo de la misma finca pero carente de *T. melanosporum*, y un "blanco" al que se le añadió agua esterilizada en vez de extracto de DNA de suelo.

En los 10 pocillos restantes de cada gel, se construyó una escala con diferentes cantidades de ADN a partir de un DNA-Lambda original de 500 µg/ml y una longitud de 48.502 pares de bases (New England BioLabs[®], Ipswich, MA, EEUU). Este DNA-Lambda es un marcador de peso molecular de ADN que se extrae del bacteriófago Lambda, el cual infecta a *Escherichia coli*, después de la digestión con la enzima HindIII. Para obtener una escala adecuada a los resultados de nuestras muestras, se diluyó y se consiguió un estándar de 1, 4, 5, 10, 30, 50, 70, 80, 100, y 200 ng de lambda DNA.

Junto con la escala externa Lambda-DNA, se elaboró una escala con micelio de trufa negra que se añadió a suelo sin *T. melanosporum* de la misma parcela del estudio. A partir de 3 g de trufa y 1 g de suelo fresco cribado se realizaron un

conjunto de diluciones con suelo, hasta llegar a una concentración de 11,4 μg de micelio por gramo de suelo fresco. El límite inferior de detección para el suelo se obtuvo con 22,9 μg de micelio por gramo de suelo fresco cribado (Figura 2).

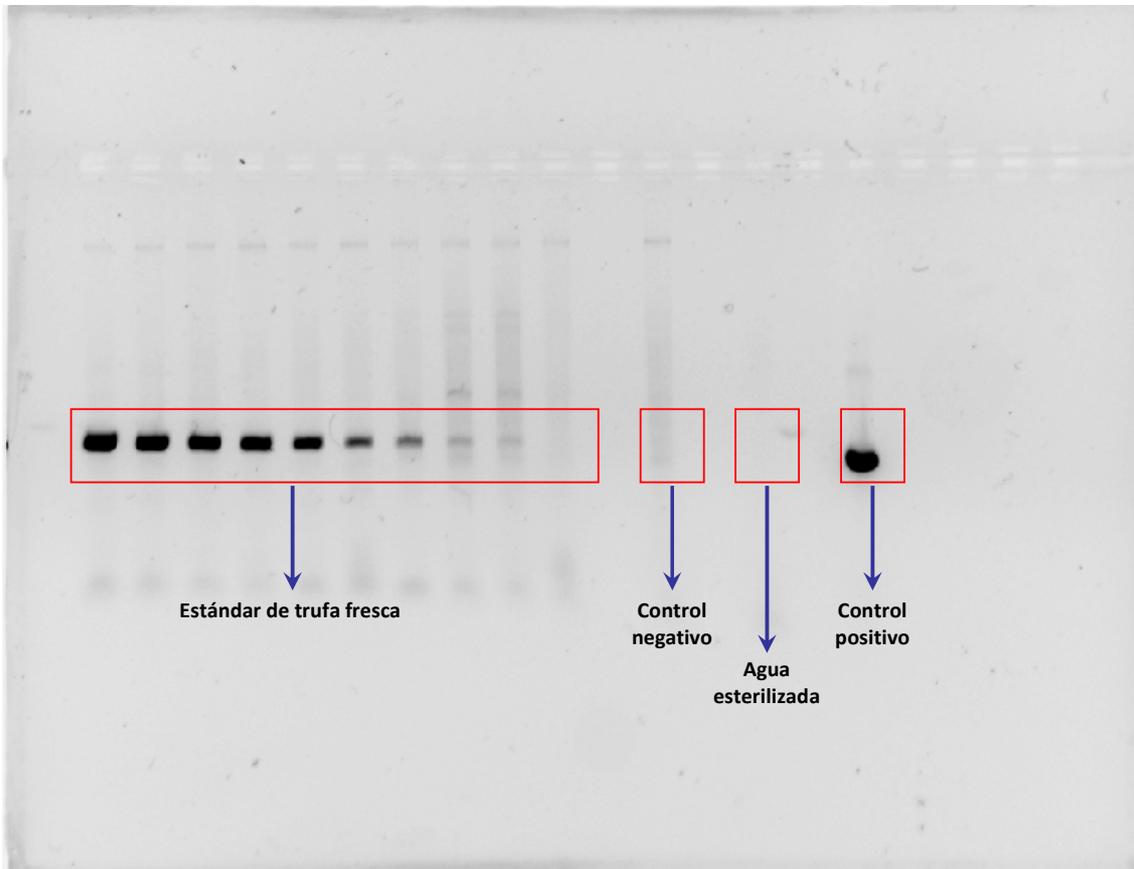


Figura 2. Gel de electroforesis con la escala de micelio de trufa en suelo fresco, y los controles positivos y negativos.

De esta manera se estableció la relación entre los valores de Lambda-DNA y de micelio por unidad de suelo fresco cribado, mediante las lecturas de intensidad de pixeles en un mismo gel (Figura 3). Dicha relación fue:

$$\text{Miligramos de micelio de trufa} = 0,02120379 \cdot \text{Lambda-DNA}^{0,99444324}$$

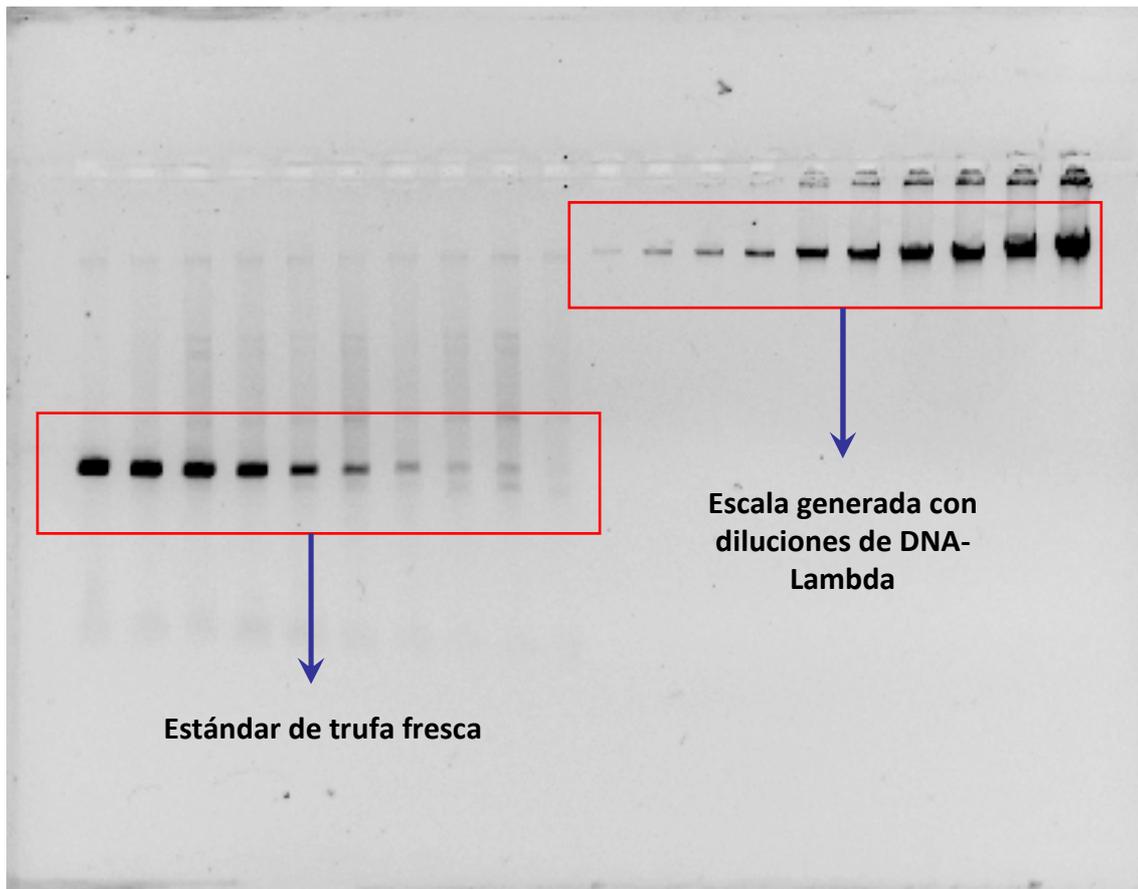


Figura 3. Gel de electroforesis con la escala de micelio de trufa en suelo fresco, y la escala de Lambda-DNA.

El análisis de la imagen de los geles de agarosa se realizó utilizando el programa Gel Doc 2000-QuantityOne (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Utilizando la opción de contorno del volumen, se seleccionaron las bandas obtenidas en el gel, repitiendo el proceso tres veces para homogeneizar los resultados. Con esto se obtuvo la intensidad media de los píxeles de cada una de las bandas, tanto del ADN del suelo amplificado, como de las cantidades conocidas de Lambda. La tabla de datos generada por el programa QuantityOne se exportó al Excel 2004 para el posterior tratamiento de los datos. Esta metodología de cuantificación fue descrita por Raeymaekers, L. (2002) y utilizada por Lacourt *et al.* (2002) y Barbieri *et al.* (2002).

Las unidades de Lambda DNA se obtuvieron mediante el ajuste de una función potencial entre las intensidades de píxeles de cada una de las bandas generadas por las 10 diluciones del Lambda-DNA, y los propios valores conocidos de dicho

Lambda. Estos ajustes presentaron coeficientes de determinación entre el 0,97 y el 0,99 (Figura 4).

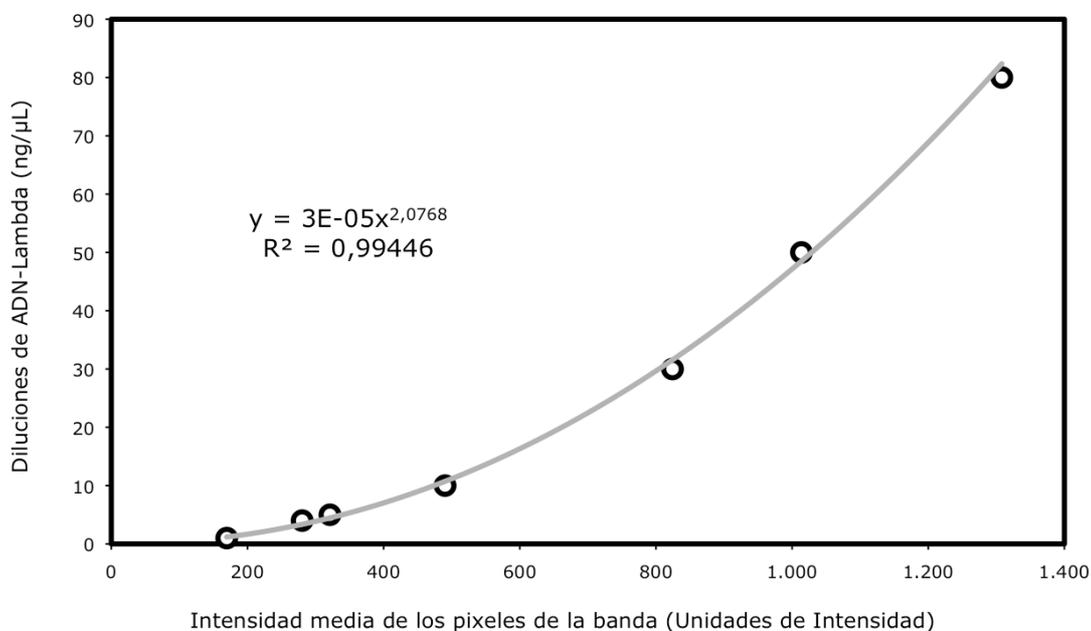


Figura 4. Curva de ajuste entre las intensidades de píxel de Lambda-DNA, y las concentraciones del mismo (ng/μl).

La función obtenida en cada gel fue única para cada proceso de PCR, electroforesis y determinación de las bandas de *T. melanosporum* en el transiluminador mediante el programa QuantityOne. Esta permitió la comparación entre las abundancias de *T. melanosporum*, manifestadas en cada banda del gel procedente de cada uno de los ocho tratamientos. Los valores de intensidad media de píxeles obtenidos dependen del tiempo de exposición del gel en el transiluminador. La escala con diluciones DNA-Lambda colocada en cada gel permitió homogeneizar los valores obtenidos de las muestras en cada repetición de los tratamientos.

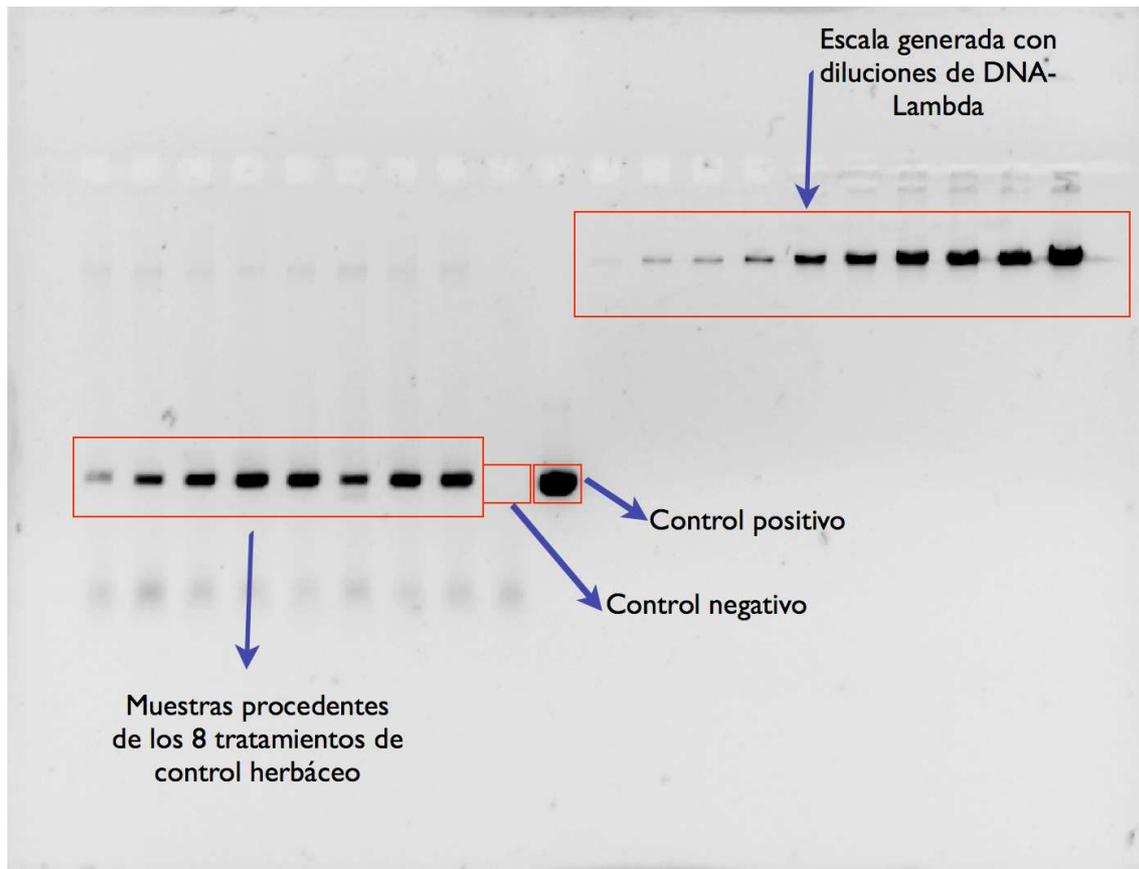


Figura 5. Gel de electroforesis donde se pueden observar las bandas resultantes de las muestras de suelo, y la escala generada a partir del Lambda-DNA.

Análisis de datos

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS (1999) (SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Los análisis se realizaron con el proceso MIXED para los análisis de varianza y de modelos mixtos en el caso de repeticiones en el tiempo o el espacio (Little *et al.*, 1996). El proceso CORR fue utilizado para estudiar las correlaciones de Pearson entre los parámetros de estudio.

Los incrementos de diámetro de las encinas fueron transformados con el logaritmo en base 10, el porcentaje de recubrimiento herbáceo con el arcoseno de la raíz cuadrada, y la cantidad de ADN con la potencia de 0,50, todo ello con el fin de responder al requerimiento del análisis de la varianza de normalidad de los valores y homogeneidad de los residuos. El test de Shapiro-Wilks y el test de Levene fueron usados para evaluar la normalidad y la homocedasticidad respectivamente. Las

medias, los errores estándar y las diferencias entre medias fueron obtenidos usando el proceso "Least Squares Means" (SAS, 1999) del proceso MIXED, previa evaluación de la bondad de ajuste de las medias.

RESULTADOS

Efecto de los tratamientos sobre la cubierta herbácea y la mortalidad

Previamente al establecimiento de la plantación, se realizaron en la parcela trabajos de limpieza de la cubierta herbácea mediante pases de cultivador, eliminándola por completo. Estos trabajos previos afectaron al desarrollo de la cubierta durante el primer ciclo de crecimiento de las encinas. Gradualmente, en las unidades testigo, la presencia de especies herbáceas fue aumentando hasta superar el 90% de recubrimiento del suelo al final del estudio, dos años y medio después de establecer la plantación. Se realizaron dos observaciones anuales del estado de la cubierta herbácea, excepto en el primer año, en el que solo se realizó una observación. El análisis de la varianza para la cubierta herbácea y el tiempo de observación fue significativo en los dos factores, así como para su interacción, todos con una $p < 0,0001$.

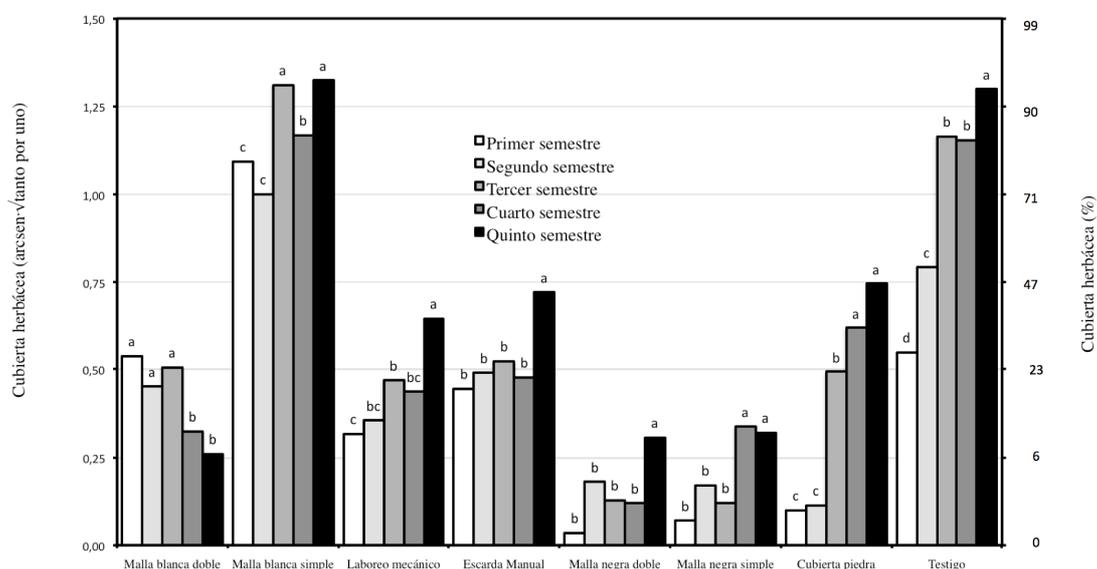


Figura 6. Porcentaje de cubierta herbácea a lo largo de los tres años y medio del estudio en función de los tratamientos realizados. Los valores de las medias están referidos en el eje de ordenadas de la variable transformada (izquierda). El eje de ordenadas de la derecha muestra la escala con la variable destransformada.

En los dos tratamientos mecánicos, laboreo y escarda manual, así como en la cubierta de piedra, el recubrimiento herbáceo siguió la misma pauta que en el testigo, aunque al final del periodo de observación no superaron valores del 50%. Se debe tener presente que los tratamientos mecánicos se realizaron alrededor de dos meses antes de la toma de datos sobre la cubierta herbácea. Esta intensidad de aplicación se mantuvo igual a lo largo de los tres años de estudio. La cubierta de piedra ejerció un buen control del recubrimiento herbáceo durante los dos primeros semestres, presentando niveles parecidos a los de los tratamientos con mallas negras, pero su eficacia se vio alterada en el tercer semestre. Al final del período de estudio el valor de cubierta herbácea bajo la cubierta de piedra se situó alrededor del 50%, porcentaje similar al ejercido por los dos tratamientos mecánicos (Figura 6).

Las mallas negras ejercieron un buen control sobre la cubierta herbácea, de manera que sus valores en los tres primeros semestres no superaron el 10%. En el cuarto semestre se observó un incremento del recubrimiento en la malla negra simple que no se encontró en la malla negra doble. Al final del estudio los valores de cubierta herbácea en las mallas negras fueron inferiores al 15%.

El comportamiento de las mallas blancas en el control de la cubierta herbácea fue muy dispar. La malla blanca simple favoreció desde el primer semestre la aparición de especies herbáceas, con una intensidad que ronda el 80%, alcanzando valores superiores al 90% al final del estudio. La evolución del recubrimiento herbáceo bajo la malla blanca doble presentó una pauta opuesta al resto de tratamientos, de manera que los mayores valores de cobertura se observaron en los tres primeros semestres, nunca superando el 30%. En el cuarto y quinto semestre los valores disminuyeron hasta ser inferiores al 15%, situándose así al mismo nivel de eficacia que las mallas negras.

La mortalidad de plántones fue muy escasa durante los tres años de estudio. En los dos primeros años se observaron cuatro plántones con todas las hojas secas pero con el tejido vascular activo, aunque el tercer año se constató la aparición de rebrotes desde el cuello de la raíz en tres de los mismos. Estos tres plántones estaban sometidos a los tratamientos de escarda manual, malla negra simple y negra doble, mientras que el plánton muerto era uno de los testigos. Así pues, la supervivencia alcanzó el 99% de las encinas observadas.

Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las encinas

Se estudió el crecimiento de las encinas, en términos de diámetro basal y altura del tallo, en dos años de crecimiento mediante tres observaciones realizadas al final de los años 2007, 2008 y 2009.

Los tratamientos tuvieron efectos significativos sobre el incremento total del diámetro ($p < 0,0048$) y de la altura de las encinas ($p < 0,0038$) en el periodo de estudio.

El análisis año a año de los parámetros de crecimiento mostró que independientemente de los tratamientos, las encinas presentaron un mayor crecimiento en la campaña 2009 que en la 2008, y no se encontró ningún efecto de interacción entre los tratamientos y la campaña de observación.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson (nivel de significación) para el ciclo de crecimiento de 2009 (n=64).

| | Incremento anual en diámetro basal (mm) | Incremento anual en altura (cm) |
|--|---|---------------------------------|
| Intensidad de la cubierta herbácea (%) | -0,061 (0,633) | -0,080 (0,538) |
| PAR reflejado desde el suelo (%) | 0,271 (0,030) | 0,066 (0,605) |

Las correlaciones de Pearson entre los incrementos anuales de crecimiento y la intensidad de cubierta herbácea no son significativos. Existe una correlación significativa del 27% entre el incremento anual en diámetro basal y la radiación fotosintéticamente activa reflejada por el suelo (Tabla 3).

Tras los dos ciclos de crecimiento, todos los tratamientos, excepto el laboreo mecánico y la malla negra doble, presentaron diferencias significativas en el incremento diametral respecto a las unidades testigo. De entre estos, los mayores incrementos se dieron en las mallas blancas y la malla negra simple (Figura 7).

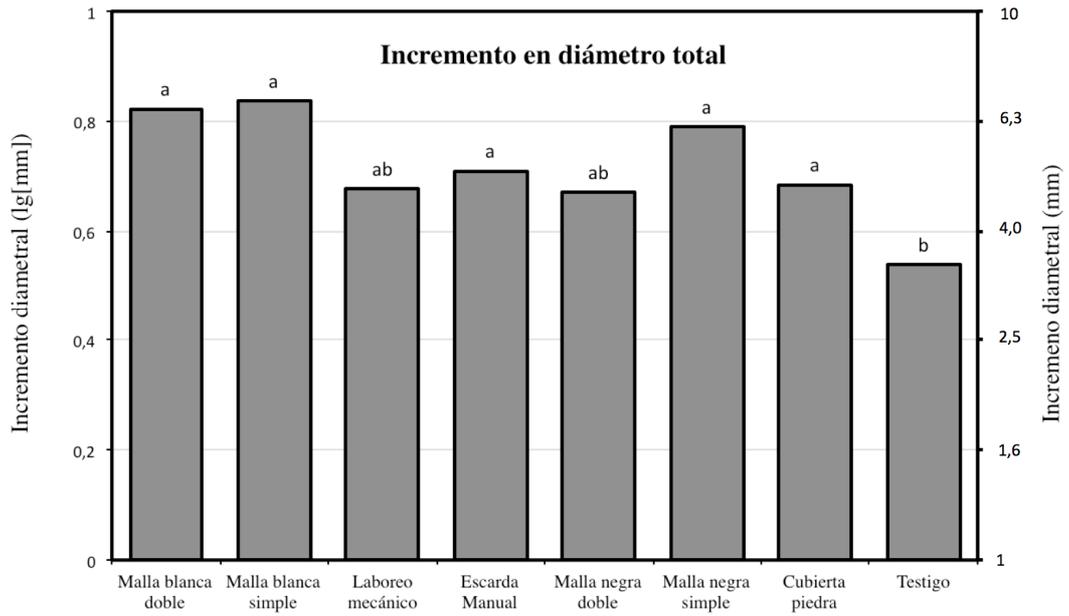


Figura 7. Incremento en diámetro total de las encinas a lo largo del período de estudio en función de los tratamientos realizados. Los valores de las medias están referidos en el eje de ordenadas de la variable transformada (izquierda). El eje de ordenadas de la derecha muestra la escala con la variable destransformada.

En cuanto al incremento en altura total al final del estudio, existen diferencias significativas respecto al testigo en todos los tratamientos excepto en el laboreo mecánico y la malla negra doble. Además, se observó un menor crecimiento de las encinas sometidas al tratamiento de laboreo mecánico respecto a las situadas en las mallas blancas simple y doble, y la malla negra simple (Figura 8).

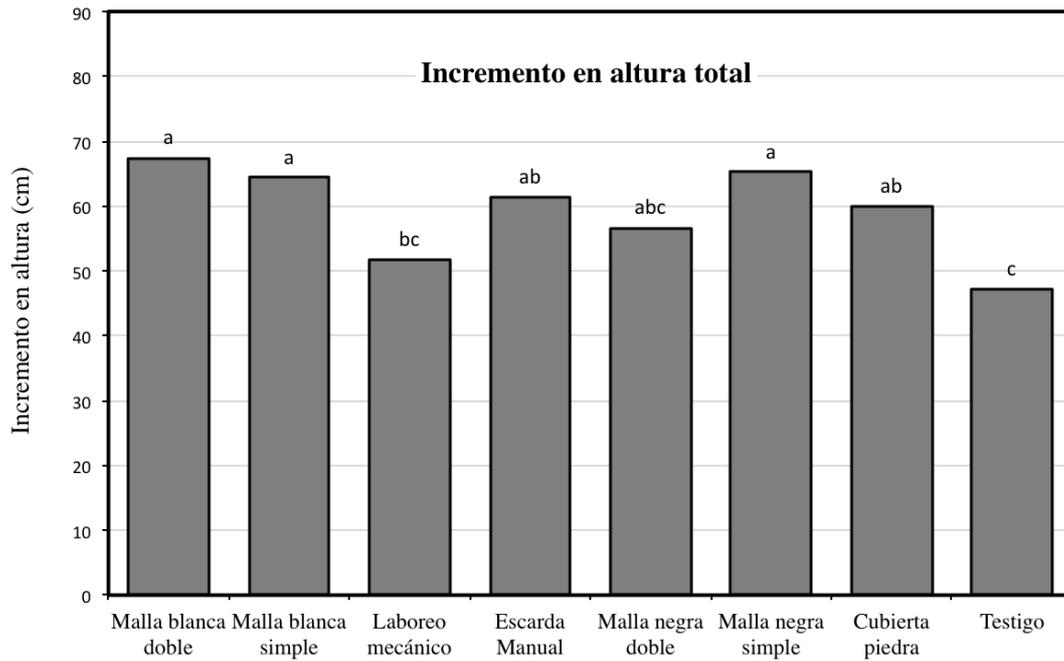


Figura 8. Incremento en altura total de las encinas a lo largo del período de estudio en función de los tratamientos realizados. Los valores de las medias están referidos en el eje de ordenadas.

Efecto de los tratamientos sobre la radiación fotosintéticamente activa reflejada desde el suelo

La radiación fotosintéticamente activa (PAR) reflejada por el suelo observada en diciembre, periodo de baja insolación, fue muy diferente en función del tratamiento de control de la cubierta herbácea. Las mallas blancas, simples y dobles, reflejaron los máximos valores, seguidas de la cubierta de piedra y el laboreo mecánico. Los valores más bajos se obtuvieron en las mallas negras y el testigo (Figura 9).

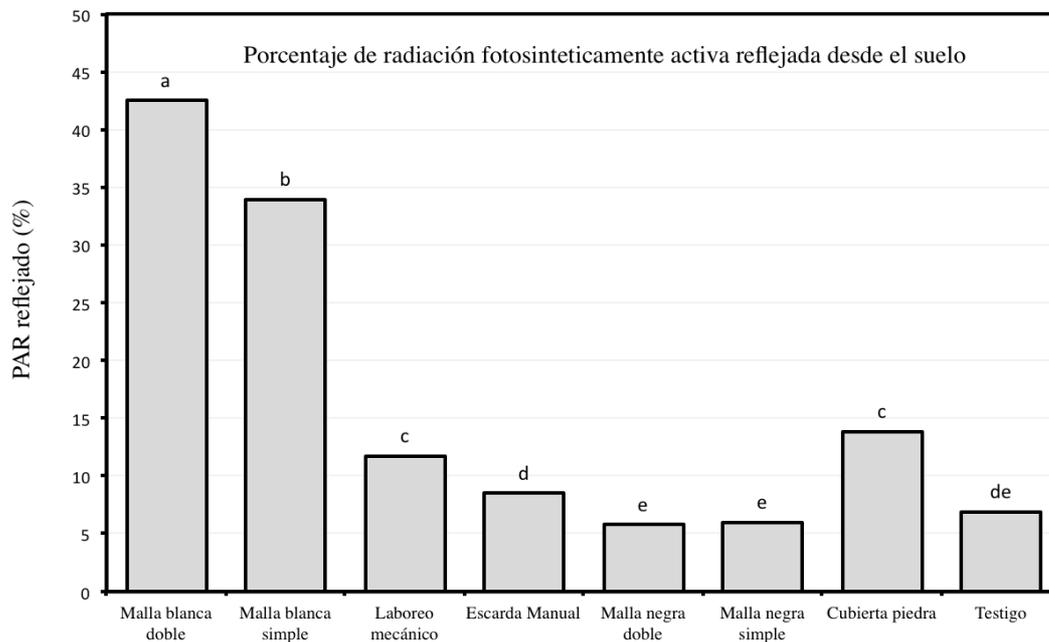


Figura 9. Porcentaje de PAR reflejado por el suelo a finales de otoño según el tipo de tratamiento de control herbáceo aplicado. Los valores de las medias están referidos en el eje de ordenadas

Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de micelio de *Tuber melanosporum* alrededor de los plantones

Los análisis de varianza para el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de micelio de *T. melanosporum* a 15 y a 30 cm fueron significativos, teniendo en cuenta que el modelo utilizado contenía el proceso PCR-Electroforesis-Cuantificación como un bloque, y el contenido de humedad de la muestra como una covariante.

A 15 cm del tronco, la presencia de micelio de *T. melanosporum* fue más abundante en el testigo que en las unidades tratadas con mallas negras, simples y dobles, escarda manual, y malla blanca simple. La malla blanca doble, la cubierta de piedra y el laboreo mecánico permitieron un desarrollo de micelio de *T. melanosporum* comparable a las unidades testigo, y en el caso de los dos primero, superior al resto de tratamientos (Figura 11).

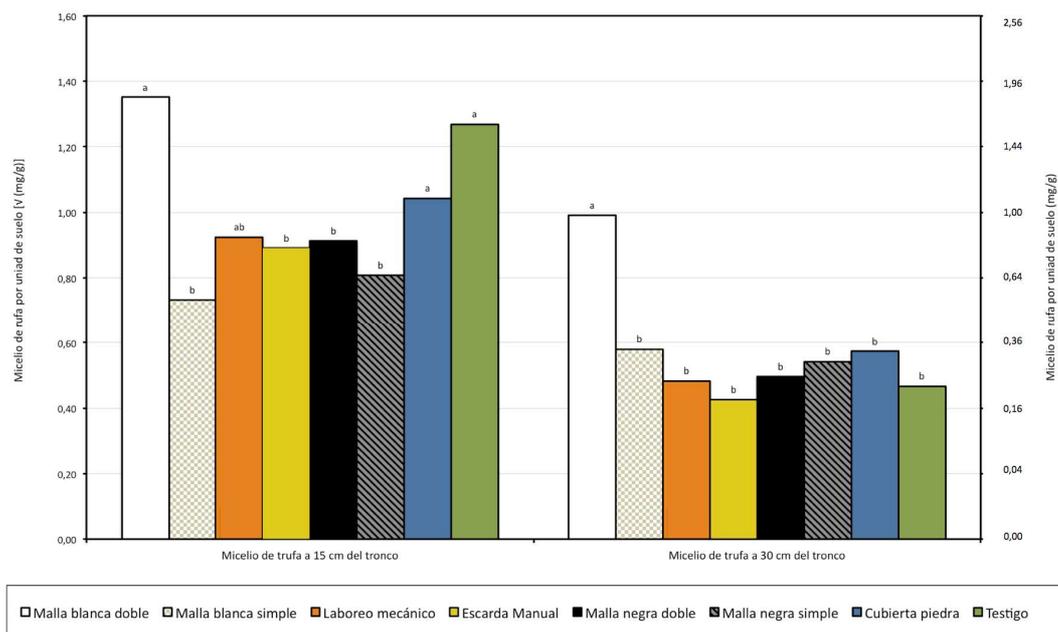


Figura 11. Micelio de *T. melanosporum* por unidad de suelo fresco cribado extraído de las muestras de suelo tomadas a 15 cm y a 30 cm del tronco de las encinas. Los valores de las medias están referidos en el eje de ordenadas de la variable transformada (izquierda). El eje de ordenadas de la derecha muestra la escala con la variable destransformada.

A 30 cm de distancia, el micelio de trufa presentó una imagen muy diferente que a 15 cm. En este caso, la malla blanca doble mostró una cantidad de micelio superior

al resto de tratamientos, incluyendo las unidades testigo. No se detectó ningún otro cambio o tendencia más entre el resto de tratamientos y el testigo.

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson (nivel de significación) para la abundancia de micelio de *T. melanosporum* a 15 cm y 30 cm de distancia del tronco de las encinas (n=64).

| | Abundancia de <i>T. melanosporum</i> a 15 cm | Abundancia de <i>T. melanosporum</i> a 30 cm |
|--|--|--|
| Intensidad de la cubierta herbácea (%) | -0,022 (0,859) | -0,080 (0,527) |
| PAR reflejado desde el suelo (%) | 0,069 (0,588) | 0,320 (0,01) |
| Diámetro final de la encina (mm) | -0,032 (0,798) | 0,286 (0,022) |
| Altura final de la encina (cm) | -0,022 (0,863) | 0,304 (0,014) |

La radiación fotosintéticamente activa reflejada por el suelo está correlacionada en un 32% con la abundancia de micelio a 30 cm del tronco, así como el diámetro y la altura final de la encina, en un 28,6% y 30,4% respectivamente (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la supervivencia de los plántones fue del 99%, y que ésta no se vio afectada por los tratamientos de control de la capa herbácea. Varios estudios han señalado la importancia de la competencia de la cubierta herbácea sobre quercíneas y pináceas en los primeros ciclos de crecimiento, especialmente en periodos de sequía y de máxima radiación solar (Rey Benayas *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 1999). La siega de la vegetación herbácea y el sombreado artificial de jóvenes encinas mejoró su supervivencia significativamente (Rey Benayas *et al.*, 2007). La importancia del sombreado en medios muy áridos quedó de manifiesto cuando plántones de *Pinus sylvestris* se plantaron junto a individuos de *Salvia lavandulifolia* ya existentes en el monte, y se compararon con los plantados a campo abierto. El resultado fue muy favorable (Castro *et al.*, 2002).

El crecimiento de las encinas de este estudio no estuvo marcado estrictamente por la cubierta herbácea, ya que no se observó ninguna correlación destacable entre los parámetros de crecimiento de las encinas y el porcentaje de recubrimiento herbáceo. El tratamiento con malla blanca simple destacó por ser muy poco efectivo para el control herbáceo; sin embargo, los mayores crecimientos de las encinas se registraron, entre otros tratamientos, en la malla blanca simple. La relevancia de la capa herbácea en el establecimiento de los plántones en el monte puede ser modificada por los periodos de sequía de la parcela y su capacidad de retención de agua (Rey Benayas *et al.*, 2005). Así por ejemplo, no se detectó ningún efecto de la competencia herbácea sobre la supervivencia de plántones de *Q. macrocarpa* y *Q. ellipsoidalis* en parcelas sin carencias importantes de agua en el suelo (Davis *et al.* 1999).

Así pues, mientras en condiciones ambientales extremas el control herbáceo puede jugar un papel muy relevante para la supervivencia y crecimiento de las encinas, en condiciones más suaves, esta competencia puede no ser tan importante. Las condiciones medioambientales del estudio fueron sin duda mucho menos estresantes que las de otros, donde la mortalidad de los plántones fue destacable. La parcela de estudio disponía de un suelo profundo, con un 3,5% de materia orgánica, textura franco-arenosa y sin carencias apreciables de nutrientes, junto con una precipitación media anual de alrededor de los 700 mm. Aún así, en nuestro estudio

los tratamientos de control herbáceo rindieron mayores crecimientos de las encinas que el testigo, que presentó abundante recubrimiento herbáceo.

Una característica que se ha apuntado como beneficiosa para la supervivencia de encinas ha sido la presencia de hongos ectomicorrícicos en las raíces de los plantones en el momento de su establecimiento en campo, o la introducción de suelo con inóculo de hongos ectomicorrícicos (Domínguez Núñez *et al.*, 2006). Este hecho fue especialmente relevante en áreas con ausencia de plantas ectomicorrícicas en los años previos al establecimiento de la plantación (Amaranthus y Perry, 1989). Generalmente, los hongos micorrícicos presentan una acción beneficiosa en cuanto a la asimilación de nutrientes y la absorción de agua (Smith y Read, 1997). Nuestro estudio se realizó en una parcela dedicada a cereal y cultivos forrajeros durante al menos 10 años antes de realizar la plantación de encina inoculada. El porcentaje de micorrizas de *T. melanosporum* introducido por planta estuvo comprendido entre el 38% y el 67%. Tal como se desprende de los resultados de la abundancia de *T. melanosporum* en el suelo, dicho hongo estuvo presente en todas las unidades estudiadas. Por lo tanto, los beneficios sugeridos acerca de su presencia en las encinas podrían ser parcialmente responsables del éxito de la supervivencia y crecimiento de la plantación. Además, la plantación de encinas debería responder favorablemente en cuanto a la adaptación al entorno, ya que la parcela está rodeada de manera natural por encinas y robles pubescentes.

La cubierta herbácea puede ejercer una fuerte competencia tanto en los plantones recién establecidos en las reforestaciones, como en las plantaciones truferas. Generalmente se atribuye a la cubierta herbácea el papel de competir con los plantones por los recursos deficitarios, principalmente la humedad del suelo (Jiménez *et al.*, 2007). La respuesta de la intensidad de la capa herbácea a los tratamientos en este estudio fue muy diferente según el tratamiento aplicado. Además, en el caso concreto de la malla blanca doble, se observó un cambio sobre su incidencia en la intensidad de cubierta herbácea a lo largo del tiempo, ya que disminuyó con el paso del tiempo. Este comportamiento fue totalmente opuesto al resto de tratamientos, que siguieron la misma pauta que las unidades testigo, incrementando la intensidad herbácea con el paso del tiempo (Figura 6). Una posible explicación para esta observación podría ser la presencia de polvo entre las dos mallas, que debido a la humedad, creó una capa opaca a la luz. De esta forma, con el

paso del tiempo, la malla blanca doble se hubiera comportado de forma más parecida a las mallas negras en cuanto a efectos de transmisión de luz. Las mallas blancas no son tan eficaces como las más oscuras en el control del recubrimiento herbáceo debido a que permiten mayor transmisión de luz. Una sola capa de malla blanca favoreció la proliferación de cobertura herbácea durante el primer y segundo semestre, comparado con el testigo.

La cubierta de piedra favoreció el crecimiento de las encinas respecto al control, pero su efecto no fue tan destacado como el de las mallas blancas y no se detectó ninguna mejora respecto al resto de tratamientos. Se ha sugerido que la colocación de piedras alrededor de encinas favorece el desarrollo de plántones de *Q. ilex* debido a la reducción de la evaporación del suelo (Jiménez *et al.*, 2007).

Existen observaciones contradictorias respecto al uso de mallas negras y sus efectos sobre los plántones en campo. En *Q. suber*, las mallas negras de polietileno no ejercieron efectos directos sobre su supervivencia ni su diámetro basal (Chaar *et al.*, 2008), mientras que en *Q. pubescens*, *Ostrya carpinifolia* y *Corylus avellana* inoculados con *T. uncinatum* se observó un aumento de la altura (Zambonelli *et al.*, 2005). En nuestro estudio, las mallas negras ejercieron un correcto control de la capa herbácea. El ligero aumento del porcentaje de recubrimiento herbáceo observado en el quinto semestre se podría atribuir al deterioro del material. Esta observación fue similar para todos los tipos de mallas, y más generalizada en las mallas simples. Esto sugiere que al cabo de tres años se debería pensar en la sustitución de las mallas. Aún así, hay que tener presente la observación de la intensidad de cubierta vegetal de las unidades testigo, donde el incremento de intensidad se va sucediendo semestre tras semestre hasta alcanzar valores superiores al 90% de recubrimiento.

La correlación significativa entre el porcentaje de PAR reflejado desde el suelo y el incremento anual del diámetro basal para el año 2009 (Tabla 3), a pesar de no ser muy relevante ($r=0,27$; $p<0,03$), sugiere una nueva perspectiva de la importancia que podría tener la actividad fotosintética de las encinas en esta fase de crecimiento. También es de destacar la escasa correlación encontrada entre la intensidad de la cubierta herbácea y el crecimiento de las encinas, que como ya se apuntó más arriba, se podría explicar por las favorables condiciones ambientales de nuestra parcela.

Los tratamientos ejecutados no favorecieron la abundancia de *T. melanosporum* a 15 cm del tronco. Además, se encuentran resultados desfavorables, especialmente en las mallas negras, los tratamientos mecánicos y la malla blanca simple. La abundancia de *T. melanosporum* en la malla blanca doble no fue diferente al testigo, pero sí superó a estos tratamientos. A 30 cm del tronco, únicamente la malla blanca doble destacó por presentar los valores más elevados de abundancia de *T. melanosporum*, superando a todos los tratamientos, incluso al testigo.

En este estudio no se detectó micelio de *T. melanosporum* más allá de los 30 primeros centímetros desde el tronco del árbol, aunque se ha encontrado micelio de este mismo hongo en encinas de 8 años de edad hasta los 2,40 m de distancia (Suz *et al.*, 2006), y de *T. magnatum* a 100 metros del árbol productivo más próximo (Zampieri *et al.*, 2010). Guidot *et al.* (2002) estudió la abundancia del basidiomicete *Hebeloma cylindrosporum* en suelo, debajo y alrededor de sus cuerpos de fructificación, detectando micelio hasta los 50 cm de distancia al carpóforo. Éste determinó que la mayor cantidad de biomasa se encontraba en las proximidades de los carpóforos, existiendo una correlación negativa entre la concentración de ADN en suelo y la distancia. Esta pauta puede observarse en todos los tratamientos de la parcela de estudio. Por contra, Van der Linde *et al.* (2009) detectó micelio de *Hydnellum peckii* y *Phellodon tomentosus* hasta 3,30 metros desde la zona de producción de esporocarpos, y además, encontró que no había una relación cuantitativa entre la distribución de esporocarpos y la abundancia de micelio.

Los acolchados pueden afectar a la proporción de inóculo y de hongos ectomicorrícicos competidores durante la fase de establecimiento de una plantación trufera, pudiendo incluso influir sobre la producción de carpóforos (Zambonelli *et al.*, 2005). Son pocos los estudios en los que se utilizan tratamientos de control herbáceo y se estudia su efecto sobre el género *Tuber*. Tratamientos de acolchado con mallas negras sobre *T. uncinatum* dieron como resultado una menor expansión del hongo en el suelo, estudiado través del número de micorrizas, y un crecimiento de las raíces muy elevado, con lo que *T. uncinatum* no podía mantener el mismo ritmo de crecimiento que el árbol, y los ápices eran colonizados por otros hongos competidores (Zambonelli *et al.* 2005). La colonización de los nuevos ápices de las raíces por parte de hongos compatibles con el huésped que todavía no están en la población que forman las micorrizas, es posible gracias a la disponibilidad de

inóculo en el suelo (Smith y Read, 1997). De ahí que con el paso del tiempo se pueda observar un aumento de nuevas especies ectomicorrícicas en las raíces de las plantaciones truferas, que pueden llegar incluso a desplazar a la especie deseada e inhibir la fructificación del hongo (De Miguel y Sáez, 1997; Giraud, 1983), a pesar de que la introducción de *T. melanosporum* puede ejercer una fuerte competencia inicial con el resto de hongos presentes en el suelo (Napoli *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio podrían sugerir que las mallas negras, que presentaron resultados desfavorables en cuanto a abundancia de micelio de *Tuber*, hubieran ejercido algún efecto que favoreciera a otras especies de hongos. También Etayo y De Miguel (2001) encontraron más cantidad de micorrizas competidoras en los árboles con acolchados plásticos, y mayor aparición de *T. melanosporum* en los tratamientos no cubiertos.

Si se compara la abundancia de micelio de *T. melanosporum* con el resto de parámetros, se observa que el testigo y la malla blanca doble rindieron diferentes resultados en intensidad de cubierta herbácea, crecimiento de las encinas, y PAR. A priori resulta especialmente complejo establecer las posibles consecuencias de las acciones de los tratamientos sobre el desarrollo del hongo productor de la trufa negra. Las correlaciones entre los parámetros observados podrían ayudar a su interpretación.

La abundancia de *T. melanosporum* está relacionada con el PAR y el desarrollo de las encinas (Tabla 4). Existe también una correlación significativa entre el PAR y el diámetro de las encinas (Tabla 3), y entre este diámetro y la abundancia de *T. melanosporum* a 30 cm del tronco (Tabla 4). Generalmente en huéspedes de *T. melanosporum* correctamente colonizados por el hongo, la producción de trufas está relacionada con el desarrollo de los huéspedes (Shaw *et al.* 1996), y un mayor porcentaje de PAR incidente se traduce en crecimientos relativos superiores de los plantones (Cardillo y Bernal, 2006). Esto lleva a pensar en el posible efecto que los acolchados pudieran ejercer sobre el micelio de *T. melanosporum* y su expansión más allá de las proximidades del tronco, a través del aumento de diámetro que supone una mayor cantidad de PAR, entre otros factores.

CONCLUSIONES

- De los tratamientos de control herbáceo evaluados en este estudio, todos los tratamientos a excepción de la malla blanca simple disminuyeron el porcentaje de recubrimiento herbáceo. Las mallas negras y la blanca doble mostraron mayor eficacia al final del estudio.

- El crecimiento de las encinas fue superior al testigo en todos los tratamientos, excepto en el laboreo mecánico y la malla negra doble.

- La supervivencia de las encinas fue muy elevada, y no estuvo influenciada por los tratamientos de control herbáceo.

- Los valores más altos de PAR se dieron en los tratamientos de mallas blancas, simples y dobles, seguidos por la cubierta de piedra y el laboreo mecánico.

- Los tratamientos de malla blanca simple, escarda manual y mallas negras presentaron una disminución de la abundancia de *T. melanosporum* respecto al testigo a 15 cm de distancia. A 30 cm la malla blanca doble superó al resto de tratamientos en cuanto a cantidad de micelio.

- El PAR podría considerarse uno de los factores a tener en cuenta en posteriores estudios dada la relación encontrada entre éste, el crecimiento de las encinas y el desarrollo de *T. melanosporum*.

- El método de cuantificación de ADN empleado es válido y eficaz para evaluar el crecimiento de micelio de *T. melanosporum* alrededor de las plantas huéspedes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaranthus, M. y Perry, D.A. 1989. Rapid root tip and mycorrhiza formation and increased survival of Douglas-fir seedlings after soil transfer. *New Forest*, 3: 259-264.

Barbieri, E.; Riccioni, G.; Pisano, A.; Sisti, D.; Zeppa, S.; Agostini, D.; Stocchi, V. 2002. Competitive PCR for Quantitation of a *Cytophaga Flexibacter-Bacteroides* Phylum Bacterium Associated with the *Tuber borchii* Vittad. Mycelium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6421-6424.

Bonet, J. A.; Fischer, C. R.; Colinas, C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agronomy for Sustainable Development*, 26: 69-76.

Cardillo, E. y Bernal, C.J. 2006. Morphological response and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings at different shade levels. *Forest Ecology and Management*, 222: 296-301.

Castro, J; Zamora, R.; Hódar, J.A.; Gómez, J.M. 2002. Use of Shrubs as Nurse Plants: A New Technique for Reforestation in Mediterranean Mountains. *Restoration Ecology*, 10(2): 297-305.

Chaar, H.; Mechergui, T.; Khouaja, A.; Abid, H. 2008. Effects of treeshelters and polyethylene mulch sheets on survival and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings planted in northwestern Tunisia. *Forest Ecology and Management*, 256: 722-731.

Ciani, A.; Sciarresi, C.; Martino, G.; Ricci, F. 1988. Tartuficoltura e recupero delle aree interne. *L'informatore agrario*, 9: 209-221.

Colinas, C.; Capdevilla, J.M.; Oliach, D.; Fischer, C.R.; Bonet, J.A. 2007. *Mapa de aptitud para el cultivo de la trufa negra (Tuber melanosporum Vitt.) en Cataluña*. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. Solsona. Lleida.

Conesa i Mor, J.A. 2001. *Flora i vegetació de les serres marginals prepirinenques compreses entre els rius Segre i Noguera Ribagorçana*. Institut

d'Estudis Ilerdencs, Fundació Pública de la Diputació de Lleida i Edicions de la Universitat de Lleida. Lleida.

Davis, M. A.; Wrage, K. J.; Reich, P. B.; Tjoelker, M. G.; Schaeffer, T.; Muermann, C. 1999. Survival, growth, and photosynthesis of tree seedlings competing with herbaceous vegetation along a water-light-nitrogen gradient. *Plant Ecology*, 145(2): 341-350.

De Miguel, A.M. y Sáez, R. 1997. Aspectos sobre truficultura en Navarra (España). Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 10: 3-9. Pamplona.

De Miguel, A. 2000. Biología de las trufas y las micorrizas. En *Jornadas de Truficultura*. Viver, El Toro (Castellón). Reyna y Folch (coord.).

Domínguez Núñez, J. A.; Serrano, J. S.; Rodríguez Barreal, J. A.; Saiz de Omeñaca, J. A. 2006. The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. *Forest Ecology and Management*, 231: 226–233.

Estrada, J. M. 1987. La trufa y la realidad de su cultivo. El cultivo racional de la trufa. *El cultivador moderno*, 809: 62-65.

Etayo, M. L.; De Miguel, A. M. 2001. Effect of mulching on *Tuber melanosporum* Vitt. mycorrhizae vs. other competing mycorrhizae in a cultivated truffle bed. *Actes du V Congrès International Science et Culture de la Truffe*. Francia: 7.378-7.381.

Fasolo Bonfante, P.; Fontana, A.; Montacchini, F. 1971. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum* i dimostrazione di un effetto fitotossico. *Allionia*, 17:48-53

Gandeboeuf, D.; Dupré, C.; Roeckel-Devret, P.; Nicolas, P.; Chevalier, G. 1997. Typing *Tuber ectomycorrhizae* by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers. *Can J Microbiol*, 43: 723-728.

García-Montero, L. G.; Manjón, J. L.; Pascual, C.; 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: 288–296.

García-Orenes, F.; Cerdà, A.; Mataix-Solera, J.; Guerrero, C.; Bodí, M.B.; Arcenegui, V.; Zornoza, R.; Sempere, J.G. 2009. Effects of agricultural management on surface soil properties and soil–water losses in eastern Spain. *Soil & Tillage Research*, 106: 117-123.

García-Orenes, F.; Guerrero, C.; Roldán, A.; Mataix-Solera, J.; Cerdà, A.; Campoy, M.; Zornoza, R.; Bárcenas, C.; Caravaca, F. 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil & Tillage Research*, 109(2): 110-115.

Giraud, M. 1983. First results of analysis of mycorrhizae in situ. (Premiers resultats des analyses de mycorhizes in situ.). *Bulletin FNPT*, 6: 23-32.

Giraud, M. y Verlhac, A. 1987. Expérimentation truffière. Derniers résultats. *Infos-Ctifl.*,32: 23-28.

Guidot, A.; Debaud, J.C.; Marmeisse, R. 2002. Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 477-486

Heptinstall, J. y Rapley, R. 2000. Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids. En Rapley, R. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*: 57-60. Humana Press Inc., Totowa, NJ, EEUU.

Jiménez, M.N.; Fernández-Ondoño, E.; Ripoll, M.A.; Navarro, F.B.; Gallego, E.; De Simón, E.; Lallena, A.M. 2007. Influence of different post-planting treatments on the development in Holm oak afforestation. *Trees*, 21: 443-455.

Jordán, A.; Zavala, L.M.; Gil, J. 2010. Effects of mulching on soil physical properties and runoff under semi-arid conditions in southern Spain. *Catena*, 81:77-85.

Krsek, M. y Wellington E.M.H. 1999. Comparison of different methods for the isolation and of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 39: 1-16.

Lacourt, I.; Duplessis, S.; Abbà, S.; Bonfante, P.; Martin, F. 2002. Isolation and Characterization of Differentially Expressed Genes in the Mycelium and Fruit Body of *Tuber borchii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4574-4582.

Littell, R. C.; Milliken, G.A.; Stroup, W.W.; Wolfinger, R.D.; Schabenberger, O. *et al.*, 1996. *SAS for Mixel Models*. Second Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU.

Merwin, I.A.; Rosenberg, D.A.; Engle, C.A.; Rist, D.L.; Fargione, M. 1995. Comparing mulches, herbicides and cultivation as orchard groundcover management systems. *Horttechnology*, 5: 151-158.

Murat, C. y Martin, F. 2008. Sex and truffles: first evidence of Perigord black truffle outcrosses. *New Phytologist*, 180: 260-263.

Napoli, C.; Mello, A.; Borra, A.; Vizzini, A.; Sourzat, P.; Bonfante, P. 2010. *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist*, 185: 237-247.

Oliach, D.; Bonet, J. A.; Fischer, C. R.; Martínez de Aragón, J.; Colinas, C. 2008. *El cultiu de la tòfona negra*. Dossier tècnic, 26; 20p. Ed. Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural. Barcelona.

Olivera, A. 2005. *Efectos de la modificación de parámetros del cultivo de la trufa sobre la proliferación de micorrizas de Tuber melanosporum Vitt.* Tesis doctoral. UdL. Lleida.

Paolocci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1997. Typing *Tuber melanosporum* and Chinese black truffle species by molecular markers. *FEMS Microbiology Letters*, 153: 255-260.

Paolocci, F.; Rubini, A.; Riccioni, C.; Granetti, B.; Arcioni, S. 2000. Cloning and characterization of two repeated sequences in the symbiotic fungus *Tuber melanosporum* Vitt. *FEMS Microbiology Ecology*, 34: 139-146.

Plana i Castellví, J.A. 1985. *Estudi climatic i balance hídric de la conca de la Noguera Ribagorçana*. Ed. Institut d'estudis catalans. Barcelona.

Raeymaekers, L. 2000. Basic Principles of Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15: 115-122.

Reyna, S. 2007. *Truficultura. Fundamentos y técnicas*. Mundi-Prensa. Madrid.

Rey Benayas, J.M.; Espigares, T.; Castro-Díez, P. 2003. Simulated effects of herb competition on planted *Quercus faginea* seedlings in mediterranean abandoned cropland. *Applied Vegetation Science*, 6(2): 213-222.

Rey Benayas, J. M.; Navarro, J.; Espigares, T.; Nicolau, J. M.; Zavala, M. A. 2005. Effects of artificial shading and weed mowing in reforestation of mediterranean abandoned cropland with contrasting *Quercus* species. *Forest Ecology and Management*, 212(1-3): 302-314.

Rey Benayas, J. M.; Fernández, A.; & Aubenau, A. 2007. Clipping herbaceous vegetation improves early performance of planted seedlings of the mediterranean shrub *Quercus coccifera*. *Web Ecology*, 7: 120-131.

Ricard, J.M.; Bergougnoux, F.; Callot, G.; Oliver, J.M.; Pargney, J.C.; Sourzat, P. 2003. *La truffe. Guide technique de trufficulture*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris.

Samils, N.; Olivera, A.; Danell, E.; Alexander, S.J.; Fischer C.; Colinas C. 2008. The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. *Economic Botany*, 62(3): 331-340.

Sánchez-Andrés, R.; Sánchez-Carrillo, S.; Benítez, M., Sánchez-López, A. 2006. Tillage induced differential morphometric responses and growth patterns in afforestation with *Quercus ilex*. *Soil & Tillage Research*, 90: 50-62.

SAS, 1999. *SAS/STAT User's Manual*. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Shaw, P. J. A.; Lankey, K.; Jourdan, A.; 1996. Factors affecting yield of *Tuber melanosporum* in a *Quercus ilex* plantation in southern France. *Mycol Res*, 100(10): 1176-1178.

Smets, T.; Poesen, J.; Knapen, A. 2008. Spatial scale effects on the effectiveness of organic mulches in reducing soil erosion by water. *Earth-Science Reviews*, 89: 1-12.

Smith, S. E. y Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition. Academic Press, Inc.; London, U.K.

Suz, L. M.; Martín, M. P.; Colinas, C. 2006. Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 254: 251-257.

Suz, L.M.; Martín, M.P.; Fischer, C.R.; Oliach, D.; Colinas, C. 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*-*Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiology Letters*, 285: 72-78.

Taylor, A.F.S. 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil*, 244: 19-28.

Truax, B. y Gagnon, D. 1993. Effects of straw and black plastic mulching on the initial growth and nutrition of butternut, white ash and bur oak. *Forest Ecology and Management*, 57: 17-27.

Van der Linde, S.; Alexander I.; Anderson, I.C. 2009. Spatial distribution of sporocarps of stipitate hydroid fungi and their belowground mycelium. *FEMS Microbiology Ecology*, 69: 344-352.

Wallander, H.; Nilsson, L. O.; Hagerberg, D.; Baath, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist*, 151: 753-760.

Zampieri, E.; Murat, C.; Cagnasso, M.; Bonfante, P.; Mello, A. 2010. Soil analysis reveals the presence of an extended mycelial network in a *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 43-49.

Zambonelli, A.; Iotti, M.; Zinoni, F.; Dallavalle, E.; Hall, I.R. 2005. Effect of mulching on *Tuber uncinatum* ectomycorrhizas in an experimental truffiere. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33: 65-73.