



ESTUDIO DE LAS ECTOMICORRIZAS EN UNA TRUFERA CULTIVADA SITUADA EN OLÓRIZ (NAVARRA)

ETAYO, M.L. Y DE MIGUEL, A.M.

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, 31080 Pamplona, España.

RESUMEN

ETAYO, M.L. Y DE MIGUEL, A.M. (1998). Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra). *Publ. Bio. Univ. Navarra, Ser. Bot.*, 11: 55-114

En el presente trabajo se aportan los resultados obtenidos en el estudio de las ectomicorrizas presentes en una trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra), plantada con árboles (encinas, robles y avellanos) micorrizados por la trufa negra *Tuber melanosporum* Vitt., a partir de los muestreos realizados estacionalmente en primavera y otoño durante los años 1996 y 1997.

Se han clasificado un total de 7 tipos micorrícicos, en 5 de los cuales se ha identificado el simbiote fúngico a nivel de especie. Se analiza también la evolución de la micorriza de *T. melanosporum*, así como las diferencias entre los tres tipos de árboles y la influencia de los tratamientos de acolchado.

Palabras clave: ectomicorrizas, trufera cultivada, Navarra, acolchado.

SUMMARY

ETAYO, M.L. Y DE MIGUEL, A.M. (1998). Study on the ectomycorrhizae of a cultivated truffle bed located in Olóriz (Navarra). *Publ. Bio. Univ. Navarra, Ser. Bot.*, 11: 55-114.

An experimental plot planted with mycorrhized trees for the culture of black truffle has been monitored in order to know its mycorrhizal state.



A total of 7 mycorrhizal types was classified, for 5 of which the fungus was identified at the species level. The evolution of *T. melanosporum* mycorrhizas and other competing mycorrhizae during two years was also studied as well as the differences among the three tree species (oak, hazel and evergreen oak) and the influence of mulching treatments (straw and plastic).

Key words: Ectomycorrhizae, truffle bed, Navarra, mulching.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	58
I. LA TRUFA.....	58
1. Introducción histórica.....	58
2. Usos y tradiciones en el mundo.....	59
3. Tipos de trufas. Las falsas trufas.....	60
4. La trufa negra. Características. Ciclo.....	62
II. LAS MICORRIZAS.....	63
1. Las micorrizas.....	63
2. Tipos de micorrizas.....	64
3. Importancia en la naturaleza. Las micorrizas de especies arbóreas.....	66
4. Importancia de las micorrizas y aplicaciones derivadas.....	67
4.1. Aplicación práctica de las micorrizas: micorrización controlada y técnicas de inoculación en vivero.....	67
4.2. Micorrizas en protección fitosanitaria.....	67
4.3. Importancia en horticultura.....	68
4.4. Micorrizas en silvicultura, reforestación, y restauración de ecosistemas degradados.....	68
4.5. Producción de hongos de interés económico.....	69
III. TRUFICULTURA.....	69
1. Origen de la truficultura.....	69
2. Situación actual en Francia, Italia y España.....	70
3. Truficultura racional. Condiciones necesarias para el desarrollo de la trufa.....	71
3.1. Fisiografía.....	71
3.2. Suelo.....	72
3.3. Flora y vegetación favorable o relacionada con la trufa.....	72
3.4. El quemado.....	74
3.5. Área potencialmente trufera en España.....	74
3.6. Zona óptima para el desarrollo de la truficultura en Navarra.....	74
OBJETIVOS.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
I. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	76
1. Situación geográfica de Olóriz.....	76

2. Geología.....	76
3. Litología.....	76
4. Bioclimatología.....	76
5. Biogeografía.....	78
6. Vegetación potencial.....	78
7. Edafología.....	79
8. Conclusión.....	79
II. DESCRIPCIÓN DE LA PARCELA.....	80
1. Historia de la parcela.....	80
2. Orientación.....	80
3. Suelo.....	80
4. Número de árboles.....	80
III. METODOLOGÍA.....	81
1. En campo.....	81
1.1. Métodos.....	81
1.2. Material necesario.....	82
1.3. Muestreo.....	82
2. En laboratorio.....	82
2.1. Limpieza y observación.....	82
2.2. Determinación.....	83
2.3. Conservación de las muestras.....	84
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	84
I. INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS.....	84
II. CATÁLOGO DE MICORRIZAS IDENTIFICADAS.....	85
1. Especies del género <i>Tuber</i>	86
1.1. <i>T. melanosporum</i> Vitt.....	86
1.2. <i>T. aestivum</i> Vitt.....	88
1.3. <i>T. albidum</i> Pico.....	88
1.4. <i>T. brumale</i> Vitt.....	89
1.5. <i>T. rufum</i> Pico.....	90
2. Otras micorrizas distintas de <i>Tuber</i>	90
2.1. Micorrizas tipo AD.....	90
2.2. Micorrizas formadas por hongos Basidiomycotina.....	91
2.2.1. <i>Hymenogaster cf. citrinus</i> Vitt.....	91
3. "Otros".....	92
III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS MUESTREOS.....	92
1. Resultados por árboles simbiotes en el conjunto de los cuatro muestreos.....	95
2. Resultados por tratamientos en el conjunto de los cuatro muestreos.....	96
3. Contaminaciones. Evolución en el tiempo.....	97
3.1. Contaminaciones por árboles simbiotes.....	97
3.2. Contaminaciones por tratamientos.....	100
3.3. Contaminaciones. Totales.....	102



4. Evolución de las diversas especies de micorizas en el tiempo.	102
4.1. <i>Tuber melanosporum</i>	102
4.2. <i>Tuber brumale</i>	104
4.3. <i>Tuber albidum</i>	104
4.4. <i>Tuber rufum</i>	104
4.5. <i>Tuber aestivum</i>	104
4.6. Micorizas tipo AD.	105
4.7. "Tipo <i>Tuber</i> ".	105
4.8. Basidiomycotina.	105
4.9. Otros.	105
CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	109

INTRODUCCIÓN

I. LA TRUFA.

1. Introducción histórica

La trufa, siempre rodeada de un halo de misterio, fue cantada por escritores, buscada para las mesas de los que podían costear su alto precio, pero su naturaleza y su origen permanecen misteriosos hasta fin del siglo XIX.

Conocida desde la antigüedad, la trufa ha despertado gran interés por parte del hombre. Pitágoras la cita en el siglo VI a. C.. Posteriormente Teofrasto (siglo III a. C.) atribuye el origen de las trufas a los truenos. Unos siglos más tarde, Dioscórides sostuvo que eran raíces tuberificadas. Cicerón supuso las trufas hijos de la tierra, mientras Porfirio las consideró hijos de los dioses. Plinio el Viejo las consideró callosidades de la tierra y milagro de la naturaleza (PACIONI, 1987). Brillat-Savarin en su libro "Fisiología del gusto" calificó la trufa como "el diamante de la cocina" (REYNA, 1991)

El primero en observar la anatomía interna de las trufas fue Micheli (1792) seguido de Fries (1923), Vittadini (1831) y Tulasne & Tulasne (1851).

El descubrimiento de la relación simbiótica entre los árboles y los hongos se debe al estudio realizado por Frank (1885) para promover el desarrollo en Prusia de la producción de trufa. Entonces Frank, acuñó el término micorizas utilizado hasta nuestros días.

Curiosamente se da el hecho de que el primer libro impreso de micología fuera el "Opusculum de Tuberis" de Ciccarelli que trata precisamente de trufas (PACIONI, 1987).



La trufa es por tanto, un hongo que por su interés gastronómico a lo largo de siglos y su propio misterio, ha dado lugar a multitud de posibilidades de investigación: de ella partió el estudio de las micorrizas, con sus múltiples líneas actuales, y también en cierto modo, el estudio de los hongos. Todo esto encaminado a desvelar el misterio de su origen, formación y desarrollo, dirigido a lograr su cultivo y producción por el hombre, para no depender del capricho de la naturaleza.

2. Usos y tradiciones en el mundo.

Trappe (1990) recoge usos y tradiciones relacionadas con las trufas (como terminología genérica) en el mundo.

En **África y Oriente Medio** las trufas del desierto, probablemente servidas a los faraones, y mencionadas en el Talmud judío, eran especies de *Terfezia*, *Tirmania*, y *Phaeangium*.

Las trufas del desierto no dependen de los animales para dispersarse sino que son los granos de arena llevados por el viento los que junto con el calor y la sequía rompen las paredes del esporocarpio, que están formadas por células grandes de paredes finas que se colapsan con la sequía. Las esporas son dispersadas por el viento. *Terfezia* y *Tirmania* fructifican prolíficamente en estas áreas en años de condiciones favorables. Esta abundancia de trufas está recogida en el Talmud, haciendo admisible la idea de que el maná de los israelitas fueran trufas del desierto. (TRAPPE, 1990)

Los beduínos hoy en día usan las trufas como comida, y como medicina para los ojos inflamados (enfermedad común en el desierto) y, en el caso de *Phaeangium lefeburei* como cebo para atrapar pájaros. Los bosquimanos del desierto de Kalahari del Sur de África han recolectado *Terfezia pfeilii* desde el inicio de los tiempos.

El uso de las trufas en **Asia** está poco documentado. Aunque abundan los hongos hipógeos, la medicina tradicional china parece no incluirlos.

En la base del Himalaya se sabe que se recolecta *Tuber indicum* Cooke & Massee. Se puede encontrar en los mercados de esta zona, lo mismo que otras trufas no conocidas. En Nepal poseen una tradición oral respecto a la recolección y comida de los hongos hipógeos. En Japón, una región es famosa por su sopa de *Rhizopogon* sp.

En **Australia y Nueva Zelanda** los aborígenes recolectaban hongos hipógeos. Los maoríes de Nueva Zelanda apreciaban ciertas especies hipógeas. Las tradiciones indígenas del uso de hongos hipógeos se han perdido desafortunadamente.



Tanto en **Norte América** como en **Sudamérica** abundan los hongos hipógeos pero el único testimonio de su utilización viene de los indios de México. En el último siglo se observó a una tribu recolectar *Melanogaster* y actualmente hongos del género *Rhizopogon* se consumen en las poblaciones rurales. En los ritos religiosos se usaba *Elaphomyces granulatus* y su parásito *Cordyceps* spp. Los nativos americanos debieron tener conocimiento de las trufas pero se han perdido los usos.

En **Europa**, son apreciadas por sus cualidades gastronómicas sobre todo en Francia y en Italia, y también en España y Grecia. Principalmente se consume *Tuber melanosporum*, pero también *Tuber aestivum* o *T. magnatum*.

A lo largo de los siglos XVIII y XIX, se incrementó bastante el consumo de trufas como manjar culinario, uso que se ha extendido hasta nuestros días y que es, junto con la escasez, el causante del alto precio que alcanzan las trufas en el mercado.

3. Tipos de trufas. Las falsas trufas.

Si definimos trufas como hongos hipógeos, podemos hablar de trufas en casi todas las subdivisiones de los hongos verdaderos.

Los hongos hipógeos son "macro-hongos" que han evolucionado, para evitar la desecación que supone el medio terrestre, desarrollando y reteniendo sus cuerpos fructíferos productores de esporas bajo tierra. Se clasifican dentro de las tres subdivisiones principales del reino Fungi: *Zygomycotina*, *Basidiomycotina*, (órdenes Agaricales, Boletales, Cortinariales, Phallales, Russulales, Stereales) y *Ascomycotina* (Elaphomycetales, Pezizales). Incluso los *Deuteromycotina* pueden formar estructuras hipógeas que asemejan cuerpos fructíferos, por ejemplo *Cenococcum geophilum* (Link. Fr.) Fr. La similitud de hábitat, sin embargo, ha resultado en una similitud superficial de la forma del cuerpo fructífero. La mayoría de las especies, de cualquier subdivisión, producen cuerpos fructíferos que son relativamente simples en estructura, globosos o irregulares, con una región interna productora de esporas, la gleba, rodeada y protegida por la capa externa, el peridio. (PEGLER, 1993).

Los *Zygomycotina* esporocápicos hipógeos se encuadran dentro de las Mortierellaceae (Mucorales) y Endogonaceae (Endogonales). Sólo se consideran "trufas" aquellas especies macroscópicas que parecen análogas a las verdaderas (Ascomycotina) o falsas trufas (Basidiomycotina). Se excluyen las que tienen estado esporocáptico pero son conocidas por esporas ectocápicas.

Las trufas anamórficas. *Deuteromycotina*. Como hongos imperfectos, los *Deuteromycotina* no presentan estado sexual, aunque generan esporas asexuales o

conidios. A este grupo pertenece el hongo hipógeo *Cenococcum* Moug & Fr. caracterizado por esclerocios de 1-5 mm de diámetro, globosos, lisos, con aspecto de corcho marrón oscuro a negro.

Mucho más importantes son las falsas trufas de la subdivisión **Basidiomycotina**. Éstos representan la principal subdivisión de los hongos Eumycota.

Todas las especies de Basidiomycotina hipógeos son de la subclase Holobasidiomycetidae (con basidios no septados, frente a los Phragmobasidiomycetidae, que presentan septos). El hábito subterráneo de estas "falsas trufas" presenta similitudes con la estructura y apariencia de los gasterocarpos, es decir, una capa externa protectora o peridio que rodea a una región interna productora de esporas o gleba.

El término trufa en sentido estricto debería designar solamente hongos Ascomycotina hipógeos, pero los Basidiomycotina han experimentado una evolución paralela hacia el hábito hipógeo y un desarrollo paralelo del uso por el hombre (TRAPPE, 1990).

Por último las especies de trufas más apreciadas por su valor gastronómico son especies de **Ascomycotina** (Pezizales) caracterizadas por una cubierta externa o **peridio** de diversa apariencia y una zona interna productora de esporas o **gleba** recorrida por venas.

En general, las formas hipógeas han evolucionado de las epígeas. Las presiones de selección natural pueden haber sido en gran parte climáticas. Los estreses climáticos como el frío, calor, sequía se dieron mientras los hospedadores de los hongos evolucionaban. Los esporocarpos que no emergen bajo esos estreses, a veces, maduran bajo tierra.

Como esta maduración subterránea no permite la dispersión de las esporas por el aire, se da una selección paralela hacia la producción de sustancias aromáticas que atraigan a los animales hambrientos. Así, una reducción de la complejidad de la estructura (estipe, sombrero, himenio, etc.) estaría acompañada de una química mucho más evolucionada, nichos ecológicos más especializados y protegidos y dependencia de los animales para la dispersión de esporas.(TRAPPE, 1990). Son numerosos los trabajos sobre la evolución de las trufas y su situación filogenética. (O'DONELL, *et al.*, 1997; BERBEE & TAYLOR, 1993), así como sobre las relaciones con mamíferos. (JOHNSON, 1996 y JOHNSON, 1997).



4. La trufa negra. Características. Ciclo.

La trufa negra es la más apreciada por sus cualidades culinarias, lo que unido a su alto valor económico, hace que sea la más buscada por los truferos. Como trufa verdadera pertenece a los Ascomycotina. El género *Tuber* es el más representado entre las trufas europeas, a él pertenece la trufa negra, la blanca y otras menos apreciadas gastronómicamente.

Dentro de las trufas, es la negra la que ha captado mayor interés por lo que fue la primera de la que se intentó su cultivo.

Los primeros intentos para plantear el cultivo de la trufa se basaron en desentramar el ciclo biológico que describimos a continuación, para saber en qué punto se puede intervenir y así optimizar su cultivo.

Ciclo. Ante condiciones favorables de humedad y temperatura, en los meses de abril-mayo, se da la germinación de las esporas de la trufa, que dan lugar a un micelio que se extiende por el sustrato hasta contactar con una raíz de un árbol con el que es capaz de establecer simbiosis. A partir de este momento, el micelio crece recubriendo externamente la raíz, y penetra a través de las células corticales. Así se constituye la **micorriza**.

El micelio nacido de las micorrizas primarias o de las que permanecen de las formadas el año precedente, o perennes, va a colonizar otras raicillas, lo mismo que el suelo. Este micelio colonizador del suelo se va a extender al mismo tiempo que las raíces van creciendo y transformándose en micorrizas de las cuales partirán hifas que darán lugar a los primordios de trufas, mayo-junio, que poco a poco formarán trufas maduras, si resisten el verano. En otoño se para el crecimiento de las micorrizas. En esta etapa son importantes las micorrizas perennes, es decir, micorrizas que van a resistir el invierno conservando el micelio que puede invadir nuevas raicillas. Este modo de transmisión es a menor distancia, pero es más seguro que las esporas. Los primordios que aguanten el verano llegarán a la madurez al final del invierno, principios de primavera, época propia para la recolección (diciembre-marzo) en la que liberarán sus esporas. (GRENTE, 1974; DELMAS, 1978)

Este ciclo biológico se ha estudiado fundamentalmente, para ver dónde se puede incidir de cara a favorecer el desarrollo de primordios y su maduración propiamente dicha, para acelerar el momento de la fructificación. Una de las líneas en la que más se ha trabajado es en la de la micorrización de plantas en vivero por *Tuber melanosporum* y su introducción en parcelas de "cultivo". Con esto se consigue favorecer el desarrollo de la especie fúngica en campo, a nivel del sistema radicular, e incrementar con ello la probabilidad de fructificación; además se

adelanta la entrada en producción de los ejemplares, y se dispone de una zona muy precisa para realizar la recolección.

II. LAS MICORRIZAS.

1. Las micorizas.

Como ya se ha indicado, hacia 1880, el profesor A. B. Frank fue el encargado de hacer un estudio sistemático para promover la producción de trufas en Prusia. No tuvo éxito en el cultivo de trufas, pero describió la estructura y funcionamiento esencial de una relación simbiótica entre los árboles y los hongos que por primera vez denominó “mykorrhiza”, del griego, *mykos* (hongo) y del latín *Rhiza* (raíz). (ALLEN, 1991: Frank, 1885). Alguna descripción morfológica anterior, las observaciones de Frank, y la intrusión de Kamienski (1882) en el mutualismo entre *Monotropa* y sus hongos asociados, inició el interés en las micorizas y su importancia en la supervivencia de las plantas y la producción.

Aunque el término micorriza fuera acuñado por Frank, las características estructurales y ecológicas habían sido reconocidas anteriormente. Hartig (1840) ilustró una ectomicorriza y una micorriza orquidoide. Kamienski describió la naturaleza de la micorriza monotropeide en 1882.

Según ALLEN (1991), De Bary (1887) diferenció varios tipos de simbiosis. La simbiosis se define como el estado resultante cuando dos organismos viven en contacto íntimo, pero De Bary reconoció varios tipos de simbiosis incluyendo parasitismo, comensalismo, amensalismo, neutralismo y mutualismo. La tabla 1 indica los tipos de simbiosis entre organismos según la relación entre éstos sea positiva, negativa o neutra.

Tabla 1.- Tipos de simbiosis entre organismos. (Tomada de ALLEN, 1991)

ESPECIE 2	ESPECIE 1		
	+	0	-
+	MUTUALISMO	COMENSALISMO	PARASITISMO
0	COMENSALISMO	NEUTRALISMO	AMENSALISMO
-	PARASITISMO	AMENSALISMO	ANTAGONISMO

Las asociación micorrícica es, según ALLEN (1991): “una simbiosis mutualista entre la planta y el hongo localizada en una estructura similar a la raíz en la que la energía se mueve primariamente de la planta al hongo y los recursos inorgánicos se mueven desde el hongo a la planta. Esta asociación se encuentra en un amplio rango de hábitats, desde acuáticos a desérticos, bosques tropicales, grandes latitudes y altitudes.”



A pesar de que el término **micorrizas** implica la asociación de hongos con raíces, se han encontrado relaciones llamadas micorrícicas, las cuales están relacionadas con la absorción de nutrientes desde el suelo, entre hongos y los órganos subterráneos de los gametofitos de algunos briofitos y pteridofitos, así como en las raíces de espermatofitas y en los esporofitos de la mayoría de pteridofitos. Los fósiles confirman que la colonización de la tierra estuvo ligada a los organismos simbióticos. (SMITH & READ, 1997).

Tradicionalmente, las micorrizas han sido consideradas rarezas biológicas y excepciones, cuando la investigación ha ido demostrando que están ampliamente extendidas por las familias de plantas y que parecen haber evolucionado con las primeras plantas terrestres. Así sólo hay unas pocas familias no micotróficas (Brassicaceae, Chenopodiaceae, Juncaceae, Equisetaceae, Isoetaceae) aunque últimamente se ha sugerido que también presentan invasiones fúngicas aunque las relaciones fisiológicas no están muy definidas.

2. Tipos de micorrizas

Según STRULLU (1991) Las micorrizas se separan en tres grupos principales: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas.

Estos grupos a su vez, se subdividen en otros, variando un poco la clasificación según los autores. Podríamos reestructurar el esquema precedente de forma que englobásemos en los tres grupos anteriores todos los tipos citados por SMITH & READ (1997), de la siguiente forma:

- Ectomicorrizas.
- Endomicorrizas.
 - Vesículo-arbusculares (VA).
 - Ericoides.
 - Orquidoides.
- Ectendomicorrizas.
 - Arbutoides.
 - Monotropoides.

La clasificación facilita un poco la comprensión. A continuación pasaremos a describir cada tipo de micorriza.

a) ECTOMICORRIZAS

Podríamos definir las ectomicorrizas como aquellas en las que la relación con el hongo es puramente externa, es decir, el hongo no penetra en las células de la raíz sino que forma una estructura llamada manto, o vaina, la cual envuelve la raíz. Esto es, una maraña de hifas que rodean a la raíz. Desde el manto radian hacia el sustrato hifas o rizomorfos.



Las hifas penetran entre las células de la raíz para formar un sistema intercelular complejo, que en sección parece una red de hifas, llamada, red de Hartig, pero no hay penetración intracelular.

Las principales familias de plantas que son huéspedes de estos hongos son: Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Tiliaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Ulmaceae, Corylaceae, Rosaceae y Fabaceae.

Los hongos capaces de formar este tipo de asociación pertenecen a los Basidiomycotina, Ascomycotina, y raramente a los Zygomycotina.

b) ENDOMICORRIZAS

Se llaman así porque el hongo penetra en las células de la raíz y no se queda simplemente en el espacio intercelular como ocurría con las ectomicorrizas.

El hongo penetra en las células corticales y no forma capa fúngica externa.

Vesículo-arbusculares: Formadas por el 80-90 % de las especies vegetales y hongos Zygomycotina, se caracterizan porque el hongo se desarrollan en el interior de la raíz, las hifas externas no forman manto, el micelio es inter e intracelular. Las hifas intracelulares forman arbusculos y vesículas.

Ericoides: Formadas por plantas de la familia de las Ericáceas. En ellas el hongo forma pelotones dentro de las células corticales, pero no vesículas ni arbusculos.

Los hongos formadores de este tipo de micorrizas son los Ascomycotina y raramente los Basidiomycotina.

Orquidoides: Las orquídeas forman unas micorrizas con una fisiología especial con hongos Basidiomycotina.

c) ECTENDOMICORRIZAS

Se trata de un tipo intermedio entre las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Según STRULLU (1991) las ectendomicorrizas poseen a la vez caracteres de ectomicorrizas, (manto y red de Hartig) y de endomicorrizas (colonización de células radicales).

Existen ectendomicorrizas de tipo arbutoide en *Arbutus*, *Arctostaphylos* o *Vaccinium* formadas por hongos Basidiomycotina.

Las micorrizas formadas en la raíz de las Monotropaceae poseen una red de Hartig y un manto bien desarrollado y además poseen una estructura similar a un



haustorio altamente especializada que penetra las células epidérmicas. El hongo también forma ectomicorrizas en las plantas autótrofas colindantes.

Los hongos que forman este tipo de micorrizas pertenecen a los Basidiomycotina.

3. Importancia en la naturaleza. Las micorrizas de especies arbóreas.

La mayoría de las especies arbóreas de nuestras latitudes son formadoras de ectomicorrizas.

Conviene remarcar que las ectomicorrizas existen esencialmente en las Dicotiledóneas y las Gimnospermas; este hecho está ligado a la morfología y anatomía de las raíces. Estos dos grupos poseen raíces primarias de talla limitada y especializadas en la absorción. Luego aparecen las secundarias. En las Monocotiledóneas, al contrario, las raíces primarias tienen un volumen importante y una diferenciación rápida, no formando ectomicorrizas.

Existen numerosos listados que nos indican los diversos géneros de plantas, hongos y tipos de micorrizas formadas en cada caso. (STRULLU, 1991; HARLEY & HARLEY, 1987; MARKS & KOZLOWSKI, 1973; SMITH & READ, 1997)

El número de géneros que forman ectomicorrizas no es muy importante comparándolo con los que forman endomicorrizas vesículo-arbusculares. Es importante resaltar, más que el número, que se trata, en el caso de las ectomicorrizas, de especies forestales de gran importancia. Dentro de los árboles, están muchas de las especies del hemisferio Norte: pino, abeto, picea, abeto de Douglas, roble, castaño, abedul...

Como ya se ha indicado, los hongos que forman ectomicorrizas pertenecen a los Zygomycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina.

Los Zygomycotina no desarrollan carpóforos, sino esporas aisladas o encerradas en esporocarpos. Es un grupo de poca importancia para las ectomicorrizas.

Según STRULLU (1991), la gran mayoría de especies forestales de interés económico, objeto de selvicultura pertenecen a las familias Pináceas, Fagáceas, Tiliáceas, Betuláceas, Salicáceas, Juglandáceas, Myrtáceas, Mimosáceas o Casuarináceas. Todas estas familias o géneros citados se caracterizan por la presencia **constante y obligatoria** de ectomicorrizas.

Esto ocurre en las especies que constituyen poblaciones monoespecíficas, en las zonas templadas, mediterráneas y tropicales secas. En cambio especies diseminadas representadas por especies aisladas mezcladas con las anteriores, suelen

ser endomicorrícicas. Este es el caso de Cupresáceas (*Thuja*, *Chamaecyparis*) Rosáceas (cerezo silvestre, serbal...) Aceráceas (arce), Oleáceas (fresnos), etc.

Las especies del bosque tropical húmedo son mayoritariamente endomicorrícicas con algunas excepciones.

4. Importancia de las micorrizas y aplicaciones derivadas.

Las micorrizas son de gran interés por su acción beneficiosa para la planta, para el suelo y para el ecosistema:

- Mejoran el enraizamiento y el establecimiento de las plantas.
- Incrementan la captación de iones (nutrientes) lentos, con lo que aumentan el crecimiento.
- Facilitan el ciclado de nutrientes en el sistema suelo-planta-atmósfera.
- Aumentan el nivel de tolerancia de la planta a situaciones de estrés (biótico o abiótico).
- Mejoran las propiedades físico-químicas del suelo, como por ejemplo la textura y estructura.

4.1. Aplicación práctica de las micorrizas: micorrización controlada y técnicas de inoculación en vivero.

Tanto para la selvicultura, jardinería o producción de hongos, se realiza la inoculación de las plantas en vivero. Los pasos a seguir, *grosso modo*, son los siguientes: desinfección del suelo; aplicación del inóculo; técnicas culturales para favorecer la planta y el conjunto hongo-planta. (Riego, luz, temperatura). Por último, el trasplante destaca como etapa decisiva para la supervivencia del vegetal y la micorriza.

4.2. Micorrizas en protección fitosanitaria. (STRULLU, 1991)

La micorriza interviene de forma preponderante en las interacciones microbianas. Esta influencia se ejerce de forma variable según la planta, el hongo, el ambiente....

La micorrización entraña modificaciones importantes de funcionamiento de la planta, en particular de su sensibilidad a agentes patógenos. Puede aumentar esta sensibilidad como en el caso de los patógenos de la parte aérea o en los virus.

En cambio, el modificar el ambiente edáfico con la introducción de la micorriza repercute sobre el organismo patógeno, constituyendo un efecto protector,



tanto por la protección mecánica por la barrera que constituye el manto, como por la modificación del ambiente físico-químico del suelo.

4.3. Importancia en horticultura y agricultura.

En la mayoría de las plantas herbáceas y leñosas que sirven de alimento al hombre y el ganado, las micorizas presentes son VA.

En horticultura y agricultura las micorizas son interesantes porque aumentan el crecimiento y la nutrición fosfatada, nitrogenada, absorción de agua y oligoelementos, con lo que se incrementa el rendimiento. Se produce también una mejora en la resistencia al estrés.

En la agricultura, por tanto, el efecto positivo más evidente, de las micorizas en las plantas es un crecimiento más rápido que se traduce de una forma general por un aumento de la biomasa producida. (STRULLU, 1991).

4.4. Micorizas en selvicultura, reforestación y restauración de ecosistemas degradados.

Actualmente en todas las estrategias de revegetación se tienen en cuenta las micorizas como factor importante a la hora de favorecer el establecimiento de las plantas. Las plantas que presentan micorizas enraízan mejor y sobreviven más que las no micorizadas.

Al favorecer las micorizas la absorción de nutrientes y agua, así como soportar mejor los estreses por contaminación o sequía, se están utilizando de forma aplicada para la recuperación de suelos contaminados o degradados, así como en prácticas de **reforestación**. (BAREA & HONRUBIA, 1993; BAREA & REQUENA, 1994; KROPP & LANGLOIS, 1990; ALLEN, 1989; CUDLIN *et al.*, 1996; CHANWAY, 1997; DÍAZ & HONRUBIA, 1995; DÍAZ & HONRUBIA, 1994; RODRÍGUEZ *et al.*, 1997).

En las comunidades naturales se ha desarrollado con el tiempo un equilibrio entre las plantas y sus hongos micorrícicos, pero en ecosistemas degradados se limitan las fuentes de propágulo, por tanto, se hace necesaria la introducción de hongos micorrícicos.

Otra aplicación de la micorrización controlada es la utilización para facilitar las plantaciones de protección u ornamentales en condiciones difíciles, por ejemplo la revegetación de suelos perturbados de zonas de minería o terrenos inestables de montaña, etc. (STRULLU, 1991; ALLEN, 1989; DÍAZ & HONRUBIA, 1994; DÍAZ & HONRUBIA, 1995).



4. 5. Producción de hongos de interés económico.

Por último, se puede recurrir a las asociaciones ectomicorrícicas con el objetivo de **obtener carpóforos comestibles** como las trufas o los boletos (GARCÍA, 1987; LÓPEZ, 1990; PACIONI, 1987; MANOZZI-TORINI, 1991; REYNA, 1992; SÁEZ & DE MIGUEL, 1995; SINGER, 1964). Se trata de micorrizar los árboles adecuados con el hongo adecuado y esperar a la producción de hongos. Estos hongos ectomicorrícicos, en ausencia de la micorriza, no se desarrollan, por lo que resulta muy interesante el cultivo.

Un ejemplo de esta práctica es la **truficultura**.

III. TRUFICULTURA.

1. Origen de la truficultura.

La curiosidad en torno al misterio de la trufa estuvo siempre muy viva en Francia, así en 1699 Ray descubre la presencia de “gránulos minúsculos” en la trufa (esporas). En 1766 Vigi realiza la primera expedición a la búsqueda de trufas con ayuda de perros. En 1780 De Borch publica una obra titulada “Lettres sur les truffes du Piémont” en la que se describe la germinación de esporas y la designación de las características botánicas del *Tuber borchii* Vitt.

Es importante la obra de CHATIN (1892) que es el **origen de la truficultura**.

El primer verdadero cultivo de trufa se dio en 1810 cuando un agricultor francés llamado Joseph Talon se enriqueció al sustituir los cultivos tradicionales de vid y cereales, por encinas. Al utilizar bellotas para la repoblación, unos años más tarde recogió trufas. (PACIONI, 1991).

La repoblación con bellotas de encinas truferas se extendió rápidamente, así el Señor de Gasparin acuñó su célebre frase “si queréis trufas, sembrad bellotas”.

Se sucedieron varios intentos de “sembrar trufas” hasta el avance en las investigaciones en biología y ecología de las trufas, la microbiología y micología forestal y descubrimiento de las micorrizas.

El método indirecto de cultivo de Talon fue difundido en la Exposición Universal de París (1855) por A. Rousseau. Le siguieron métodos tradicionales basados en las experiencias de Talon.

En Italia, Francolini y VANCINI (1963) sucesivamente introdujeron los métodos tradicionales de truficultura. Francolini introdujo la diseminación de esporas sobre un terreno virgen que no producía. Esto lo hacía mediante la dispersión de

trufas, de terreno de zona trufera o de micelio sobre el terreno a implantar. (SIGNORINI, 1990).

Desde Talon el cultivo de las plantas "trufíferas", es decir, con el aparato radical infectado por la micorriza de trufa, ha sufrido numerosas modificaciones.

Los métodos modernos de **Manozzi-Torini** y **Bencivenga** en Italia y del **INRA** en Francia son los actualmente utilizados para la implantación de trufas. (SIGNORINI, 1990)

2. Situación actual en Francia, Italia y España.

Los inicios de la truficultura tanto en Italia como en Francia fueron muy paralelos, siempre encaminados hacia una truficultura racional, tratando de optimizar el cultivo, con multitud de trabajos sobre micorrización en vivero y ecología de las diversas especies de trufas. Actualmente **Italia** se centra fundamentalmente en el estudio de las condiciones ecológicas, para su posible cultivo de *Tuber magnatum*

Después de un periodo de producción abundante **Francia** ha conocido un periodo de lenta regresión. La producción de trufa está en decadencia continua después del inicio de siglo. Las causas resultan de la conjunción de factores humanos, tecnológicos y climáticos: éxodo rural, desaparición de truferos por las guerras, cierre de las trufas naturales, masiva gestión de las plantaciones. (GRENTE, 1974). En las últimas décadas una serie de factores han provocado el descenso de la producción, como la recolección agresiva

España no ha sido un país con tradición en cuanto a la utilización de la trufa. Su presencia ha sido casi desconocida y el consumo, local, casi exclusivo de las personas que las recogían. Sin embargo, hay constancia de trabajos sobre el tema desde hace 3 décadas (FITE, 1962; NICOLÁS, 1973; MARTÍNEZ *et al.*, 1991; GARCÍA, 1991; CARTIÉ *et al.*, 1997; MAURI *et al.*, 1997; SAIZ DE OMEÑACA, 1992; MANSO, 1991; SÁEZ, 1991; ORIA DE RUEDA, 1989; QUINTANA, 1992.).

No existe mercado interior. No se ha potenciado su conocimiento y consumo, ni incluso dentro de las zonas productoras. La falta de organización del sector en nuestro país ha traído como consecuencia una carencia total de inversiones. Se ha buscado y recogido trufa pero no se han reinvertido parte de los ingresos obtenidos.

En las últimas décadas una serie de factores han provocado el descenso de la producción, como la recolección agresiva, el aumento de los recolectores, abandono de actividades forestales, con el consiguiente cierre arbustivo y pérdidas de producción natural; incendios, sequías, etc.



El futuro de la trufa está pues en la truficultura, la racionalización del cultivo y la organización de los mercados. (SAÉZ & DE MIGUEL, 1995)

3. Truficultura racional. Condiciones necesarias para el desarrollo de la trufa.

La potencialidad trufera de una región viene dada por las condiciones climáticas de la zona, así como las geológicas, topográficas y edafológicas. También se debe tener en cuenta la vegetación y fauna de la zona.

Las áreas truferas se sitúan en zonas calizas, lo cual, para España, nos da una zona bastante grande potencialmente trufera. Pero el sustrato no es la única característica a tener en cuenta.

El clima es un factor muy importante a considerar. Es importante tener en cuenta la **precipitación anual** que debe ser de 600-900 mm. Las primaveras no han de ser secas para favorecer el desarrollo de los primordios. BARDET & FRESQUET (1995) indican la necesidad de un aporte de agua de 15-20 mm cada 10 días y una pluviometría en abril de 90-140 mm. En verano es necesario que haya lluvias, son años buenos de trufas los que tienen fuertes tormentas de verano, favorecedoras del mantenimiento de los primordios. Tampoco es buena la sequedad excesiva en invierno. En cuanto a la **temperatura**, señalamos varios valores que guardan relación con el área geográfica donde es posible el desarrollo de la trufa (SAÉZ & DE MIGUEL, 1995; REYNA, 1992; DELMAS, 1978).

- | | |
|---|----------------|
| • Temperatura media anual | 11-14° C |
| • Temperatura máxima del mes más cálido | 23-32° C |
| • Temperatura media del mes más cálido | < 20-22° C |
| • Temperatura mínima del mes más frío | (-2)-(-6)° C |
| • Temperatura media del mes más frío | >2 °C. |
| • Temperatura máxima absoluta | 35-42° C |
| • Temperatura mínima absoluta | (-9)-(-25)° C. |

3.1.- Fisiografía

La trufa se sitúa entre los 100 y 1400 m de altitud, siendo lo normal encontrarla de 600 a 900 m y a más altitud en localidades más al Sur.

La pendiente óptima para la trufera es la inferior al 10 % y la orientación Sur, suroeste, ya que necesita insolación en el suelo. (REYNA, 1992).



3.2.- Suelo

Los autores consultados (BARDET, 1995; BARDET *et al.*, 1995; BRAGATO, 1997; BRAGATO *et al.*, 1992; CALLOT & JAILLARD, 1996; CHEVALIER & POITOU, 1990; LULLI *et al.*, 1991; MIRABELLA, *et al.*, 1993; PANINI *et al.*, 1991; PANINI *et al.*, 1993.) coinciden en las características del suelo trufero que se resumen a continuación.

Elemento del Suelo	Mínimo	Máximo
pH (H ₂ O)	7'5	8'5
Materia orgánica	15 ‰	80 ‰
C / N	≅ 10	
Ácido fosfórico total	1 ‰	3 ‰
K intercambiable	0'1 ‰	3 ‰
Mg intercambiable	0'1 ‰	0'3 ‰
Ca intercambiable	5 ‰	
Caliza total	10 ‰	

La textura de los suelos truferos es franca, es decir, ni arcillosa ni arenosa, podríamos apuntar los siguientes valores: 10-40 % de arcillas, 10-70 % de limos y 10-80 % de arenas.

Lo ideal es que el suelo tenga un buen drenaje, por eso no son buenos los suelos arcillosos, pero tampoco los muy arenosos porque no retienen el agua.

Es importante que sean suelos pedregosos.

3.3.- Flora y vegetación favorable o relacionada con la trufa.

Como árboles truferos, susceptibles de ser micorrizados por la trufa podríamos citar *Quercus pubescens*, *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. ilex*, *Corylus avellana*, *Tilia platyphyllos*, *Populus spp.*, *Castanea sativa*.

La trufa de forma natural se desarrolla en los pisos o termotipos superior mesomediterráneo y supramediterráneo inferior y medio (RIVAS-MARTÍNEZ, 1987)

En estas zonas la vegetación natural suele formar carrascales de *Q. ilex* subsp. *ballota* que se mezclan con el quejigo en algunas zonas, siendo el quejigo un mal indicador de zona trufera por ser más resistente al alto contenido en arcillas (REYNA, 1992).

Los mapas de series de vegetación nos aportan un dato muy valioso a la hora de ver la potencialidad trufera de una zona.

Dentro de las formaciones vegetales óptimas para el desarrollo de la trufa encontramos, como ya se ha indicado, los carrascales que se corresponden con la



serie meso-supramediterránea castellano-cantábrica y colino-montana navarro-alavesa de la carrasca o *Quercus rotundifolia* (*Spiraeo obovatae-Querceto rotundifoliae* S.)

Algunos autores indican formaciones de coscoja como potenciales. En concreto en Navarra, estas formaciones se localizan en áreas como la Ribera y Las Bardenas Reales que no permitirían el cultivo de trufa negra por otros factores.

Dada la elasticidad ecológica de las encinas su presencia es poco significativa para determinar la calidad del terreno parra la trufa. Por esto, es interesante conocer la distribución de especies frecuentes en áreas truferas, no micorrizógenas, pero indicadoras de la potencialidad del sustrato, como son *Prunus mahaleb*, *Prunus spinosa*, *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Vitis vinifera*, *Rosa canina*, *Pinus nigra*, *Eryngium campestre*.

El pino laricio (*Pinus nigra*) es importante por ser el estadio preclimácico del encinar calizo de clima fresco, ya que si el clima se hace demasiado frío para las truferas, deja paso a *Pinus sylvestris* y si se hace muy cálido cede el sitio al pino carrasco (*Pinus halepensis*). (REYNA, 1992).

La aparición de otras especies como *Cornus sanguinea*, *Psoralea bituminosa*, *Rubia peregrina*, por el contrario es poco favorecedora para el desarrollo de la trufa.

En los alrededores de las truferas pueden aparecer *Genista scorpius*, *Salvia lavandulifolia*. Los salviares y tomillares si no son dominantes indican buenas características para el desarrollo de trufa.

Como indicadores de humus podemos tomar especies asociadas al pastoreo como *Eryngium campestre*.

Ya en el seno de la trufera aparecen pocas especies, dominadas sobre todo por gramíneas cespitosas y matas de plantas de raíces poco profundas (*Helianthemum origanifolium*, *Sedum sediforme*). También puede aparecer gramíneas de raíces más profundas como *Stipa tenacissima*, *Stipa juncea* o *Brachypodium retusum*, *B. phoenicoides*.

La vegetación de zonas truferas ha sido ampliamente estudiada (BENCIVENGA *et al.*, 1990; BENCIVENGA & GRANETTI, 1990; BENCIVENGA, *et al.*, 1995; GREGORI *et al.*, 1990; MANOZZI-TORINI, 1991; REYNA, 1992; SOURZAT, 1994.).



3.4.- El quemado

Alrededor de una planta productora de trufas se forma un área sin vegetación, llamada quemado, "calvero" o "brûle". Este quemado está producido por acción del micelio de la trufa sobre la vegetación colindante. Son numerosos los estudios sobre el tema. El quemado ha fascinado a muchos investigadores desde los comienzos de la investigación, como lo demuestran los numerosos trabajos existentes al respecto (BONFANTE *et al.*, 1971, MONTACCHINI *et al.*, 1972; MONTACCHINI *et al.*, 1977; MONTACCHINI & CARAMIELLO, 1977; PAPA & PORRARO, 1978-79; PAPA, 1980-81; PAPA *et al.*, 1992; PLATTNER & HALL, 1995.)

Las especies que aparecen en esta zona, son por tanto resistentes a esa acción fitotóxica y su conocimiento puede resultar muy interesante.

Plantas como *Sedum* spp. o *Euphorbia* spp son resistentes, permamacen en el quemado. De forma contraria se observa cómo algunas plantas desaparecen del quemado

La festuca (*Festuca ovina*) está siendo objeto de estudio por su posible papel en el quemado. (MAMOUN & OLIVIER, 1997)

3.5.- Área potencialmente trufera en España

De acuerdo con los datos de precipitación, temperatura, suelo, sustrato geológico y vegetación podemos establecer cuál sería el área potencialmente trufera en España.

También es interesante el hecho de que en esas zonas citadas como potencialmente trufas, aparezcan citas de *Tuber melanosporum* de forma natural. (SÁEZ & MIGUEL, 1995)

3.6.- Zona óptima para el desarrollo de la truficultura en Navarra

En Navarra se tiene constancia de la existencia de trufa negra en diversas zonas: valles de Allín, Metauten, valle de Lana, Yerri, Guesalaz, pero casi nunca fue recogida por los vecinos de estos lugares, sino por personas desplazadas desde otras provincias.

Ante esta situación, un grupo de agricultores de Allín y Metauten se interesó por la truficultura, con dos objetivos. Primero pretendían recuperar las trufas naturales y la recolección de la trufa que en ella se desarrollaba. En segundo lugar, la plantación de árboles micorrizados en fincas dedicadas al cultivo de cereal o leguminosas.



Para todo ello se realizó un proyecto piloto por parte de agricultores constituidos en cooperativa, el ITG del cereal (hoy ITG agrícola) y la empresa suministradora del material micorrizado. Se trataba de conocer las técnicas de producción de la trufa negra.

Asumiendo el objetivo de la CEE de potenciar áreas deprimidas, se plantaron durante los meses de febrero y marzo de 1990, 30 hectáreas de árboles micorrizados con *Tuber melanosporum*.

Con objeto de hacer una truficultura racional y optimizar el cultivo, se busca el apoyo científico a los truferos con un proyecto de investigación entre el ITGA y el departamento de Botánica de la Universidad de Navarra para determinar el área potencialmente trufera de Navarra, así como el seguimiento de las plantaciones, para asegurar que lo que realmente se está cultivando es trufa negra.

Como fruto de los proyectos "Aspectos sobre la truficultura en Navarra. Cultivo de la trufa negra *Tuber melanosporum*. Proyecto nº 9693" y proyecto demostrativo "Desarrollo e implantación del cultivo de trufa negra en Navarra. Proyecto demostrativo 95-96" y desde la observación de las condiciones necesarias para el desarrollo de *Tuber melanosporum*, se elaboró un mapa del área potencialmente trufera en Navarra (MIGUEL & SÁEZ, 1997).

El Departamento de Botánica y el ITG siguen actualmente la investigación en 6 parcelas, 5 plantadas con anterioridad al 92 y la última, plantada en 1993 en Olóriz, gestionada por el ITG agrícola y objeto por esa razón del presente estudio. La importancia del seguimiento de la micorrización es grande, pues es el único medio para saber si *Tuber melanosporum* sigue en la parcela hasta la entrada en producción.

OBJETIVOS.

Con el siguiente trabajo se pretende el seguimiento de la parcela de experimentación situada en Olóriz (Navarra) y gestionada por el ITG agrícola, plantada con encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.), robles (*Q. faginea* Lam.) y avellanos (*Corylus avellana* L.) micorrizados en vivero por *Tuber melanosporum* Vitt.

Los objetivos perseguidos en el presente estudio son, de forma muy concreta, los siguientes:

- Seguimiento de la micorrización en los ejemplares de encina, roble y avellano, marcados para este fin.
- Caracterización de micorrizas: micorrizas de *Tuber melanosporum* y otras micorrizas.



• Estudio de la evolución de la micorrización:

- En el tiempo.
- En los diversos simbiontes arbóreos.
- En función de los tratamientos aplicados a los árboles.

Este estudio de la evolución se realiza para comprobar si se mantiene la micorriza inoculada o si por el contrario, otras micorrizas, provenientes bien de vivero, o bien de campo, invaden las raíces de los árboles.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.

Para el presente estudio se ha trabajado en la parcela de Olóriz, plantada para el cultivo de trufa en 1993.

1. Situación geográfica de Olóriz

Olóriz se encuentra situado en la Navarra Media Oriental, en la zona de la Valdorba, dentro de la Merindad de Olite. Es una localidad situada a 24 Km. de Pamplona, a 611 m de altitud. Al encontrarse en la falda de la Peña de Unzué aparece en Olóriz un gradiente al subir en altura en todas las características del terreno.

2. Geología

En cuanto a la geología, Olóriz se encuentra sobre materiales del Terciario (Según Gran Atlas de Navarra) del Mioceno y Oligoceno.

3. Litología

Predominan en Olóriz las arcillas, limos y areniscas fluviales, con una pequeña zona de conglomerados poligénicos.

4. Bioclimatología

Olóriz se encuentra (según la memoria del mapa de Series de Vegetación de Navarra) en la zona de transición de lo **supramediterráneo superior** a lo **mesomediterráneo inferior**, en ombrotipo **subhúmedo inferior-seco superior**. (RIVAS-MTNEZ, 1987)

Aunque en la cara Sur de Peña Unzué se encuentra la estación de Olóriz, no parece representativo realizar el estudio bioclimático en base a los datos de esta estación, puesto que lleva solamente 6 años funcionando. Por este motivo se eligió la

estación de Yesa, la cual se encuentra prácticamente en la misma latitud que Olóriz (42° 37' N), con una longitud de 1° 12' W frente a los 1° 38' W de Olóriz y al abrigo de la cara sur de la Sierra de Leyre.

También se han calculado los índices bioclimáticos de Olite, que es la estación más cercana aunque se encuentra en un área más seca.

4.1. Índices bioclimáticos de Yesa y Olite

a) Datos. (Tomados de ELÍAS-CASTILLO & RUÍZ-BELTRÁN, 1986).

Estación YESA	Período: 1931-80					Long: 1° 12' W			Lat: 42° 37'			Alt 388 m.	
Características Hídricas													
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	AÑO
P	809	618	715	685	724	532	328	415	655	695	762	848	7786
ETP	107	156	322	500	801	118	1365	1266	915	537	242	113	7442
Características térmicas													
MM	154	176	220	250	295	342	370	372	330	264	200	151	383
TMM	92	116	146	173	211	259	295	292	259	197	134	91	189
Tm	50	65	94	120	155	194	223	222	195	142	90	54	134
tmm	08	14	41	67	98	129	150	152	131	87	46	17	78
tmma	-62	-50	-23	09	31	72	98	98	70	24	-21	-48	-78

Estación YESA	Período: 1931-80					Long: 1° 12' W			Lat: 42° 37'			Alt 388 m.	
Características Hídricas													
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	AÑO
P	432	359	407	509	601	484	262	282	382	506	544	484	5248
ETP	112	163	329	496	796	1087	1339	1237	916	554	242	124	7395
Características térmicas													
MM	170	191	234	264	303	354	375	371	337	277	213	168	383
TMM	98	119	151	176	213	255	290	292	263	204	138	98	191
Tm	51	67	94	119	153	191	220	220	195	145	89	57	133
tmm	04	15	37	62	94	127	151	147	127	86	40	15	75
tmma	-58	-43	-19	06	31	75	107	99	72	21	-19	-43	-72

b) Cálculo de los Parámetros e Índices Bioclimáticos (RIVAS-MARTÍNEZ, 1995 y 1996)

A partir de los datos de las estaciones de Olite y Yesa se han calculado los parámetros e índices bioclimáticos que se enumeran a continuación y son reflejados en la tabla.

PARÁMETROS

T: Temperatura media anual.

m: Temperatura media de las mínimas del mes más frío.

M: Temperatura media de las máximas del mes más frío.



Tmax: Temperatura media del mes más cálido.

Tmin: Temperatura media del mes más frío.

Tp: Temperatura positiva anual - suma en décimas de grado de la temperatura media de los meses con temperatura media > 0° C-.

Pp: Precipitación positiva anual - suma de la precipitación media de los meses con temperatura media > 0° C-.

ÍNCICES BIOCLIMÁTICOS

Ic: Índice de continentalidad simple: $Ic = Tmax - Tmin$

It: índice de termicidad: $It = 10 (T+m+M)$

Io: Índice ombrotérmico anual: $Io = 10 (Pp / Tp)$

Ios: Índices ombrotérmicos estivales

Ios₂: Índice ombrotérmico estival del bimestre más cálido del trimestre estival: $Ios_2 = P \text{ julio+agosto} / T \text{ julio} + \text{agosto}$

Ios₃: Índice ombrotérmico estival del trimestre estival: $Ios_3 = P \text{ junio+ julio} + \text{agosto} / T \text{ junio} + \text{julio} + \text{agosto}$

Ios₄: Índice ombrotérmico estival del cuatrimestre resultante de la suma del trimestre estival y del mes inmediatamente anterior.: $Ios_4 = P \text{ mayo} + \text{julio} + \text{julio} + \text{agosto}$

	Alt	T	m	M	It	Tmax	Tmin	Ic	Tp	Pp	Io	Ios ₂	Ios ₃	Ios ₄
Olite	388	13.3	0.4	9.8	235	22.0	5.1	16.9	1601	524.8	3.27	1.24	1.63	2.08
Yesa	491	13.4	0.8	9.2	234	22.3	5.0	17.3	1604	778.6	4.85	1.67	2.00	2.52

Según estos cálculos podríamos decir que **Olite** pertenece al bioclima **Mediterráneo Pluviestacional Oceánico**. Dentro de este bioclima, el termotipo de Olite es **Mesomediterráneo**, con ombrotipo **subhúmedo**.

Yesa, por el contrario, se encuentra justo en la zona de transición de lo mediterráneo a lo Templado. Su bioclima es el **Templado oceánico**. Pertenece al termotipo **colino**, ombrotipo **subhúmedo**.

5. Biogeografía

Biogeográficamente, Olóriz se encuentra en la región Mediterránea, Provincia Aragonesa, Sector Castellano- Cantábrico. (LOIDI & BÁSCONES, 1995).

6. Vegetación Potencial

Según LOIDI & BÁSCONES (1995), la serie de vegetación que más zona de Olóriz cubre es la serie meso-supramediterránea castellano-cantábrica y colino-montana navarro-alavesa basófila de la carrasca o *Quercus rotundifolia* (*Spiraea obovatae- Querceto rotundifoliae* S.) Esta serie, es la que correspondería cubriría a la parcela.



En la etapa madura de dicha serie de vegetación, en el estrato arbustivo encontramos *Spiraea hypericifolia* subsp. *obovata*, *Juniperus communis*, *Lonicera estrusca*, *Amelanchier ovalis*, *Hedera helix*, etc., propias de bosques ombrófilos así como *Rubia peregrina*, *Rhamnus alaternus*, *Ruscus aculeatus*, o *Juniperus phoenicea*, más propias de bosques esclerófilos.

La etapa de sustitución primera es un espinar del tipo *Amelanchiero ovalis-Spiraeum obovatae*, formado por especies como *Amelanchier ovalis*, *Spiraea hypericifolia* subsp. *obovata*, *Rosa agrestis*, *Rosa nitidula*...

Al desaparecer la orla se establecen matorrales de brezo (*Erica vagans*), otavera (*Genista occidentalis*) y gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* subsp. *crassifolia*). También aparecen entre este matorral, formaciones herbáceas de *Bromus erectus*, *Brachypodium pinnatum* subsp. *rupestre*, *Helicotrichon cantabricum* y otros.

Una pequeña zona del término de Olóriz corresponde a la serie meso-supramediterránea castellano-cantábrica del quejigo o *Quercus faginea* (*Spiraeo obovatae-Querceto fagineae* S.)

Por último también aparece en Olóriz un poquito de la serie pirenaica occidental y navarro-alavesa del roble pubescente o *Quercus humilis* (*Roso arvensis-Querceto humilis* S.)

7. Edafología.

En cuanto a los suelos (ÍÑIGUEZ *et al.*, 1982), la mayor parte de término de Olóriz presenta suelos someros sobre material deleznable, constituyendo éstos un **Typic Xerorthent**. Según la clasificación de la FAO serían Regosoles.

El pueblo se encuentra sobre suelos de la Serie Aibar con inclusiones de someros sobre material deleznable. Se trata de un **Calcixerollic-Xerochrept**, limoso fino, mezclado, méxico. Es un Cambisol cálcico.

8. Conclusión.

En base a lo expuesto anteriormente, la parcela de cultivo situada en Olóriz se encuentra en una **zona potencialmente trufera**, tanto por la climatología que presenta como por la vegetación potencial y el tipo de suelo.

La parcela está ubicada en Olóriz porque previamente a su plantación se estudió su potencialidad trufera de acuerdo con los parámetros más importantes para la optimización del cultivo. Estas condiciones óptimas se han descrito en la introducción del presente trabajo.



II. DESCRIPCIÓN DE LA PARCELA.

La parcela está situada, como ya se ha indicado, en Olóriz a unos 600 m de altitud. Tiene una extensión de 0'6 Ha.

1. Historia de la parcela. Anteriormente se cultivó cereal, lo cual es beneficioso, ya que el tipo de micorizas que tienen los cereales es endomicorizas y no van a competir con la trufa los posibles restos de inóculo que queden en el terreno.

Se plantó en 1993 inicialmente con 219 plantas, según los marcos de plantación 7x4, 6x4, y 5x4. Los árboles eran de procedencia francesa en el caso de los avellanos y de las encinas, mientras que los robles los suministró una empresa española.

2. Orientación. Es una parcela orientada hacia el Oeste, orientación elegida cuando se plantó la trufera, ya que para el cultivo de la trufa la mejor orientación es la Oeste o Sur, nunca la Norte.

3. Suelo. Previamente a la implantación de la parcela se realizó un análisis de suelo de la misma que confirmó su idoneidad como suelo trufero.

4. Nº de árboles. Actualmente consta de 11 filas x 30 columnas, con un total de 217 árboles repartidos de la siguiente forma: 74 encinas, 35 robles y 108 avellanos. En porcentajes, esto representa un 34 % de encinas, un 16 % de robles y un 50 % de avellanos.

Ante la falta de referencias previas en España en el tema de la truficultura, el Instituto Técnico y de Gestión Agrícola (ITGA), encargado de los aspectos agronómicos de la parcela, recurrió a someter a los árboles a diferentes tratamientos de acolchado con paja o con plástico, para ver, en un futuro, si estos tratamientos influyen en la producción de trufas. De estos árboles plantados se marcaron 45 para su posterior muestreo, de tal forma que quedasen señalizados 5 de cada tratamiento de acolchado (con paja y con plástico) y 5 sin tratamiento o testigos. Esto se hizo para cada una de las especies arbóreas (encina, roble y avellano). Estos tratamientos de acolchado influyen en la humedad del suelo circundante al árbol, ya que se trata de colocar paja o plástico negro alrededor del tronco del mismo. Además de favorecer el mantenimiento de la humedad, la paja, actúa positivamente frente a las temperaturas extremas. También aporta elementos nutritivos al cuerpo fructífero y mantiene una microflora favorable para su desarrollo. El acolchado con plástico negro también mantiene el terreno en buenas condiciones de humedad, pero carece de otras propiedades que aporta la paja. Se utiliza durante los primeros años de

plantación para favorecer el arraigue de las jóvenes plantas y evitar la competencia de las malas hierbas.

III. METODOLOGÍA.

1. En campo.

La metodología de recolección de muestras es laboriosa y complicada. Para conocer el estado de la micorrización es necesaria la toma periódica de muestras, los muestreos se realizan en la primavera y el otoño, por ser estas épocas en las que el micelio se encuentra en mayor actividad. Se trata de tomar muestras de raíces en la zona superficial (10-20 cm de profundidad) en los límites del quemado, sin dañar el árbol. El muestreo además debe ser representativo.

1.1. Métodos.

GIRAUD (1988) propone las metodologías de muestreo de árboles truferos que se resumen a continuación.

a) Método de Sectores

Para árboles al menos de 5 años y está adaptado al estudio fino de un árbol dado.

- Se trazan 2 ejes perpendiculares, por ejemplo Norte-Sur, Este-Oeste.
- Se marcan los puntos de muestreo en cada eje a distancia creciente desde el tronco, a los 25-50 cm o 1 m según la importancia del árbol.
- Se toman en cada punto las raicillas, evitando dañar el aparato radical, las raíces gruesas.
- Si el árbol es grande se podrá buscar también en los ejes intermedios, Noeste-Suroeste.
- Para cada punto se prepara una bolsa de plástico etiquetada con las referencias del punto y del árbol.

Este método permite una representación espacial de la micorrización del árbol que se podrá seguir en el tiempo.

Lo negativo del método de sectores es la dificultad y lo pesado que es de realizar, además de no permitir el estudio de un número suficiente de árboles para ver el estado micorrícico de la plantación.

b) Método global

Permite tener una idea general de la micorrización de la parcela porque se aplica a todos los árboles sea cual sea su edad.

Es el utilizado por nosotros.



Está adaptado al estudio de un tratamiento, de las variaciones debidas al terreno y permite una interpretación estadística.

- Se numeran e identifican los árboles a analizar sobre el plano de la parcela.
- Para cada árbol se toman muestras de puntos elegidos al azar en la zona de exploración radical. El número de puntos varía según la edad del árbol (4 a 10).
- Cada muestra se mete en la bolsa que lleva las referencias del árbol.
- **Si el árbol es muy joven se limitará a un muestreo a nivel del cuello** para no comprometer su desarrollo. Prácticamente hasta ahora, es a lo que se han tenido que limitar nuestros muestreos por ser esta parcela una plantación joven.

1.2. Material necesario.

Para realizar estos muestreos es necesario llevar azada, navaja, tijeras, un bidón con agua, bolsas o botes etiquetados, rotuladores indelebles, cuaderno, lápices...

1.3. Muestreo.

Siguiendo el método global, se cava un agujero de 15-20 cm de diámetro, en un punto elegido al azar, en nuestro caso se hace en orientación Sur, y se buscan las raíces superficiales. La experiencia nos dice que cuando el árbol es joven, el muestreo debe realizarse a bastante profundidad, porque las raíces superficiales son escasas. El siguiente paso es recoger las raíces, comprobar que son del árbol, y tapar el agujero. Estas raíces se mojan para evitar su desecación y se colocan en su bote, con su notación.

En los muestreos se toman raíces de los 45 árboles marcados. Como ya se ha explicado, disponemos de 15 árboles de cada especie arbórea, repartidos de 5 en 5 en los distintos tratamientos de acolchado, con paja o con plástico, así como 5 que no presentan acolchado. De estos árboles se recogen las muestras de la zona cercana al cuello. Se lavan cuidadosamente las raíces en campo, para evitar su desecación y se meten en botes debidamente etiquetados y marcados con la notación correspondiente al árbol en el que han sido recogidas.

2. En laboratorio.

2.1. Limpieza y observación.

Una vez en el laboratorio las muestras se lavan cuidadosamente en una placa de Petri. Si las muestras están muy sucias se añaden al agua unas gotas de

TWEEN 80. El lavado de las raíces se completa a la lupa, con ayuda de un pincel fino, quitando lo más posible los restos de sustrato y suciedad que haya.

Bajo la lupa se separan aquellas micorizas que macroscópicamente parezcan diferentes. Para la observación macroscópica de las ectomicorizas se siguen las directrices marcadas por AGERER (1987-96). Se tienen en cuenta aspectos como el tipo de ramificación, longitud del sistema micorrízico, longitud de las puntas sin ramificar, diámetro de estas puntas y de los ejes, el color, si tiene o no rizomorfos, características de la superficie del manto. AGERER (1987-96) describe las diferentes morfologías de micorizas y estandariza la forma de describir nuevas formas.

La observación microscópica debe centrarse principalmente en la superficie del manto, el tipo de células que presenta pudiendo ser un manto plectenquimático o pseudoparenquimático principalmente. En el primer grupo las hifas se pueden distinguir como individuales, se ven laxas, sueltas; en el segundo es imposible distinguir las hifas como individuales porque han incrementado su diámetro o han formado células cortas de forma irregular formando un verdadero tejido. AGERER (1987-96) define 16 tipos principales de manto.

2.2. Determinación

Una vez elegida la micorriza a observar, a la lupa, se coloca en un portaobjetos, se añade una gota de agua o mejor de ácido láctico, se tapa con un cubreobjetos y se observa al microscopio.

El primer paso es observar el micelio que sale desde la micorriza y ver si presenta fibulas, típicas de los Basidiomycotina. Lo interesante entonces, o si no hay micelio, es observar el manto.

En lo que respecta a las micorizas del género *Tuber* su manto es pseudoparenquimático pudiendo diferenciarse dos tipos de diseño de las células: o poligonal o en puzzle, que separaremos entre ellas por características de las espinas que emanan del manto, el color, etc. En los resultados se describen ampliamente los principales tipos estudiados por nosotros y sus diferencias.

Para la determinación de especies existen numerosos trabajos que describen las características de las principales especies que aparecen en las trufas. (BENCIVENGA *et al.*, 1992; FONTANA *et al.*, 1992; GRANETTI, 1994; 1995; GRANETTI *et al.*, 1995a, b c; MEOTTO *et al.*, 1994; 1995; RAUSCHER *et al.*, 1995; ZAMBONELLI *et al.*, 1993). Por ser un trabajo de "estudio de micorizas en una trufera cultivada", inicialmente hemos recurrido a la bibliografía francesa e italiana, por ser países que nos preceden, en experimentación en truficultura.



2.3. Conservación de las muestras.

Una vez estudiadas, las muestras pueden conservarse constituyendo una micoteca de micorrizas. Las raíces se guardan, etiquetadas, en botes que contienen una mezcla de alcohol etílico o metílico, ácido acético, formaldehído y agua en la siguiente proporción: 666 cc. de alcohol, 50 cc. de acético puro, 50 cc. de formol y agua hasta completar 1 litro. (GIRAUD, 1988).

RESULTADOS Y ANÁLISIS.

I. INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS.

Tras la toma de muestras según el método anteriormente descrito se analizaron las raíces de los diversos árboles. Del análisis macroscópico y microscópico se identificaron las diferentes especies a las que pertenecían esas micorrizas.

La mayoría de los trabajos referentes a las micorrizas que aparecen en este tipo particular de explotaciones truferas (GIRAUD, 1988; GRANETTI, 1995; BENCIVENGA *et al.*, 1992; MEOTTO *et al.*, 1995; ZAMBONELLI, 1993) recogen como especies o tipos más frecuentes los que se indican en la tabla siguiente. Estos autores destacan, además de las micorrizas del género *Tuber*, algunas de caracteres parecidos a las de este género.

Las micorrizas del género *Tuber* presentan una cubierta pseudoparenquimatosa. Esto hace que se distingan fácilmente al microscopio las células que forman el manto, lo cual nos permite distinguir entre las especies cuyas micorrizas tienen una cubierta en puzzle, y las que presentan esta cubierta poligonal.

La siguiente tabla (tabla 2) recoge este carácter y el de las espinulas. Además se incluyen en la tabla especies o tipos, que no tratándose del género *Tuber*, aparecen en las trufas cultivadas y su aspecto puede llevar a confusión.

Tabla 2.- Tipos de micorrizas de las trufas según su cubierta.

CUBIERTA EN PUZZLE	
Espinas ramificadas en perpendicular	<i>Tuber melanosporum</i> Vitt.
Espinas cortas, con base ensanchada, agudas.	<i>Tuber brumale</i> Vitt.
Espinas más largas que <i>T. brumale</i> , muy agudas y aciculares.	<i>Tuber albidum</i> Pico
Espinas muy agudas. Parecida a <i>Tuber albidum</i>	<i>Tuber magnatum</i> Pico
Cubierta en puzzle no muy clara. Espinas escasas y granuladas	<i>Tuber rufum</i> Pico



Tabla 2.- Tipos de micorrizas de las trufas según su cubierta (cont.).

CUBIERTA POLIGONAL	
Pelos largos, no ramificados, flexibles, con granulaciones apicales y engrosamientos intercalares o terminales, micelio de color pardo	<i>Tuber aestivum</i> Vitt.
Espinas largas, no tan flexibles como <i>T. aestivum</i> . Algunos cistidios bifurcados en la base.	<i>Tuber mesentericum</i> Vitt.
Cubierta poligonal poco perfecta	<i>Tuber excavatum</i>
Micelio ramificado en perpendicular.	AD
Espínulas cortas, parecidas a <i>T. brumale</i> , pero con bucles.	SB
Espínulas ramificadas en ángulo recto, con fíbulas.	Tipo <i>Hymenogaster</i>
CUBIERTA PLECTENQUIMÁTICA	
	<i>Scleroderma</i>
	<i>Hebeloma</i>

II. CATÁLOGO DE MICORRIZAS IDENTIFICADAS.

Dentro de las micorrizas observadas podemos hablar de las producidas por especies de hongos conocidas y las que están causadas por hongos aún sin identificar. Hay que tener en cuenta que para saber qué hongo forma una micorriza hay que seguir su ciclo biológico hasta encontrar el cuerpo fructífero. En algunos casos todavía no se conoce la especie del hongo porque su micelio no ha podido ser aislado, cultivado y posteriormente inoculado en el árbol.

Al describir las especies de micorrizas vamos a hacer incapié en la micorriza de *Tuber melanosporum* Vitt., por ser esta la que está siendo controlada y es objeto de estudio de cara a la producción, pero junto a ella aparecen otra serie de micorrizas competidoras, que bien desde vivero, o luego en campo han tomado posiciones en las raíces de los árboles. Estas micorrizas no deseadas pueden competir con la trufa y desplazarla por lo que es interesante ver qué ocurre a lo largo del tiempo en lo que respecta a la sucesión de especies. Sólo podemos comprobar la permanencia de *Tuber melanosporum* a través del análisis de las micorrizas, ya que todavía no se han producido cuerpos fructíferos. A la espera de que éstos aparezcan y poder concluir sobre la sucesión de especies, únicamente tenemos en la mano los datos proporcionados por las micorrizas.

Entre las especies competidoras describimos *Tuber brumale*, *T. rufum*, *T. albidum*, *T. aestivum* dentro de las del género *Tuber*. Respecto a las micorrizas de

otros tipos destacamos las de tipo AD y las formadas por hongos Basidiomycotina indeterminados, o conocidos como *Hymenogaster citrinus* Vitt.

Acompañamos las descripciones con ilustraciones realizadas personalmente al microscopio Meopta, mediante una videocámara "Optomic CCD Color Camera". Las fotografías se imprimen directamente mediante una video impresora "Sony video Graphic Printer UP-860CE".

1. Especies del género *Tuber*.

En general la simbiosis entre los hongos del género *Tuber* y los ápices radicales de las especies arbóreas da lugar a micorrizas de forma clavada, con el extremo redondeado. Su color varía del amarillento blanquecino cuando están jóvenes, al marrón ocráceo, o negruzco cuando viejas, variando según el árbol simbiote.

El manto, cubierta o micoclena, formada por células con lóbulos más o menos redondeados según el hongo, puede formar unos polígonos irregulares, mientras que en otras especies de *Tuber* las células son más o menos lobuladas con el contorno sinuoso dando apariencia de puzzle.

También son de importancia en el diagnóstico, caracteres de las hifas, cistidios o espinulas que emanan de la micorriza que se presentan sobre todo en la fase de crecimiento de la micorriza.

Cuando las micorrizas carecen de cistidios característicos, pero se aprecia con claridad una cubierta en puzzle, no podemos avanzar en la determinación, por tanto diremos que se trata de una micorriza de "Tipo *Tuber*" (GIRAUD, 1988).

1.1. *Tuber melanosporum* Vitt.

1.1.1. Caracteres morfológicos. Se trata de una micorriza simple o con ramificaciones de tipo monopódico, pinnado o piramidal, de ápices redondeados.

1.1.2. Color. Marrón ocráceo, ámbar oscuro. En fase de crecimiento el color es más claro, siendo el ápice blanquecino. Si observamos una micorriza muy vieja, el color es casi negro y opaco, no dejando pasar la luz a su través, y por tanto, no permitiendo observar el diseño de la micoclena.

1.1.3. Superficie de la micoclena. Presenta una cubierta en puzzle bien definida (Fig. 2). La micoclena es pluriestratificada con estructura pseudoparenquimatosa con células epidermoides.

1.1.4. Ornamentación. Sin duda es el carácter más definitivo a la hora del diagnóstico.

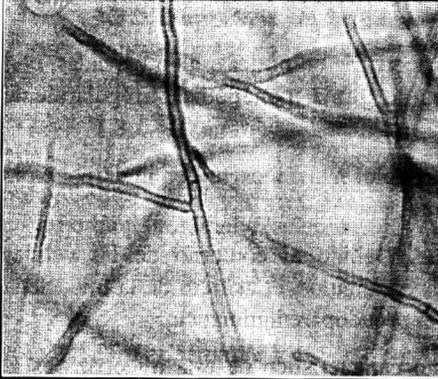


Fig. 1.- Detalle de la ramificación de las espínulas de la micorriza de *T. melanosporum* Vitt. x1000.

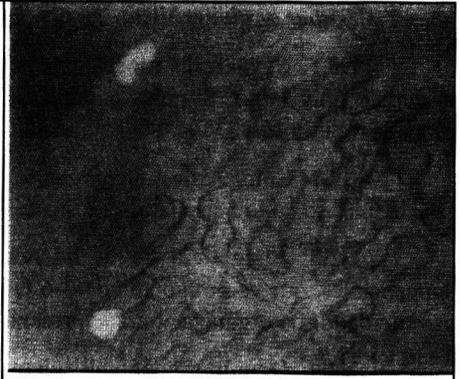


Fig. 2.- Aspecto del manto en puzzle de las micorizas de *T. melanosporum* Vitt. x1000.

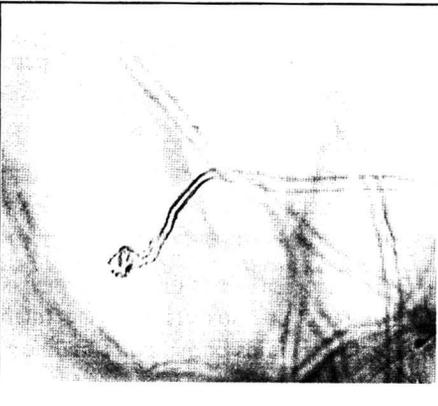


Fig. 3.- Detalle del ápice ensanchado de las espínulas de las micorizas de *T. aestivum* Vitt. x1000.

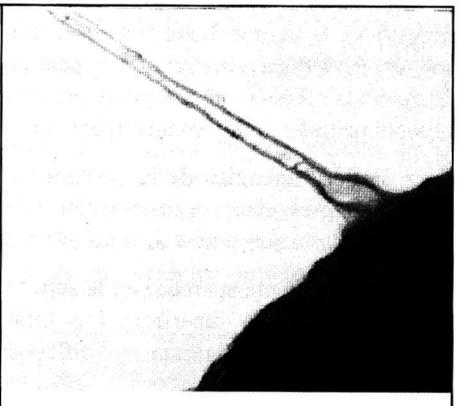


Fig. 4.- Detalle de la base ensanchada de una espínula de *T. caliculatum* Pico. x1000.

Como evidenció PALENZONA (1969) y PALENZONA *et al.* (1972), la característica de las micorizas de *Tuber melanosporum* es que presenta unas espínulas o cistidios amarillentos, alargados y ramificados en ángulo recto, pluriseptados (Fig.1.). El ápice de estas espinas es redondeado.

A la vez puede presentar hifas que parten de la micoclenu. Se diferencian de las espínulas en que tienen paredes paralelas en el punto de unión a la micoclenu, mientras que las espinas se ensanchan en ese punto.

Podemos constatar que está ornamentación se sitúa, en la mayoría de los casos en el tercio proximal de la micorriza



1.2. *Tuber aestivum* Vitt.

1.2.1. Caracteres morfológicos. Micorrizas cilíndricas, algo clavadas, con el ápice muy largo. Simples o ramificadas de forma monopodial, irregularmente pinnada o piramidal.

1.2.2. Color. Estas micorrizas son de color marrón oscuro en invierno, en la fase de reposo, algo más claras el resto del año.

1.2.3. Superficie de la micoclona. Debido al contorno de las células superficiales, que es poligonal con 3-6 lados en ángulos, el aspecto de la micoclona es reticulado. La organización que presenta es pseudoparenquimática.

1.2.4. Ornamentación. El elemento característico de esta micorriza es la presencia de espinulas o cistidios lisos o finamente granulados, marrones, muy largos, sinuosos, enredados entre ellos y septados, muy abundantes en otoño (PALENZONA, 1969). Estos cistidios presentan en el ápice ensanchado, como se muestra en la figuras 3. Hemos observado estos cistidios a la lupa, y, a diferencia de los de *Tuber mesentericum*, la apariencia es de una micorriza "peluda, pero despeinada". *Tuber mesentericum* presenta unos cistidios largos y sinuosos, pero con aspecto peinado, todos en una dirección.

Se diferencian de los cistidios de *Tuber mesentericum* porque los de esta última no presentan engrosamientos intercalares. También es constante en *Tuber mesentericum* la presencia de un cierto número de cistidios bifurcados en la base.

Raramente aparecen en la superficie de la micoclona hifas hialinas, septadas y granuladas en la superficie. Las hifas, al contrario que los cistidios, se tiñen fácilmente con azul algodón y se diferencian de estos cistidios por su color hialino y su mayor espesor.

1.3. *Tuber albidum* Pico.

1.3.1. Caracteres morfológicos. Micorrizas simples o con ramificaciones de tipo monopodial, pinnado o piramidales.

Los ápices no ramificados son clavados de rectos a ligeramente recurvados o irregulares por la presencia de estrechamientos.

1.3.2. Color. Estas micorrizas son de color ocre-marrón en estadio de reposo, ocre en fase de crecimiento, blanquecino en el ápice. La presencia de taninos entre el primero y segundo estrato de células de parénquima cortical hace que aparezca con apariencia jaspeada, con manchas. (FONTANA *et al.*, 1993) Las micorrizas viejas tienen una coloración más oscura, marrón.



1.3.3. Superficie de la micoclenua. En la parte proximal la micorriza de *Tuber albidum* presenta una organización pseudoparenquimática con células epidermoides con aspecto de puzzle.

1.3.4. Ornamentación. El elemento característico de las micorrizas de *Tuber albidum* es la presencia de espinas hialinas, alargadas con extremos redondeados y base ensanchada, muy geniculada (fig. 4). A veces aparecen 2 septos en la porción proximal y las paredes de las espinas son gruesas.

Raramente aparecen hifas hialinas septadas con superficie finamente granulosa.

1.4. *Tuber brumale* Vitt.

1.4.1. Caracteres morfológicos. Son micorrizas con forma clavada, simples o ramificadas de forma monopodial, pinnada o piramidal.

1.4.2. Color. Ámbar oscuro con menos pigmentación en la parte distal.

1.4.3. Superficie de la micoclenua. Con aspecto de puzzle, presenta una organización pseudoparenquimática. (fig. 6)

1.4.4. Ornamentación. El elemento característico de esta especie es la presencia de espínulas de color amarillento, con la punta redondeada y la base ensanchada, que presentan a veces, raramente, un septo en la base (fig. 5). (PALENZONA, 1969). Este diámetro basal de las espínulas es netamente superior al de *Tuber albidum* y *Tuber magnatum* y es un caracter importante para el reconocimiento de esta especie.

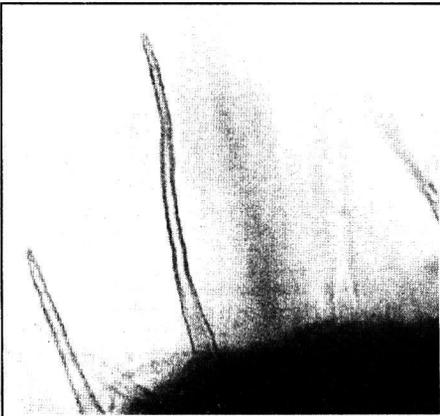


Fig. 5.-Detalle de las espínulas de la micorriza de *T. brumale* Vitt. x1000.

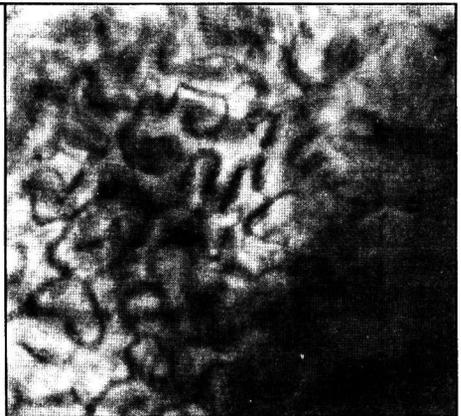


Fig. 6.-Manto en puzzle de la micorriza de *T. brumale* Vitt.



5. *Tuber rufum* Pico.

Se trata de una micorriza con la cubierta en puzzle pero no muy marcada. Las espinulas son escasas y granuladas (RAUSCHER *et al.*, 1995).

2. Otras micorrizas distintas de *Tuber*

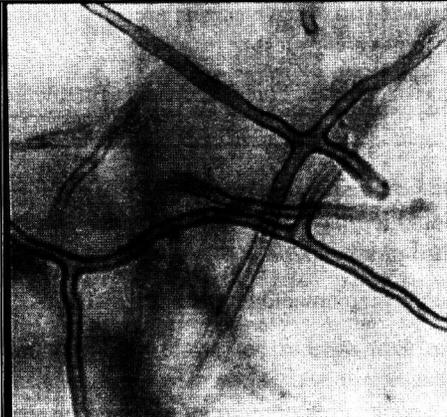


Fig. 7- Detalle de las ramificaciones en ángulo recto de las espinulas de las micorrizas de tipo AD. x1000.

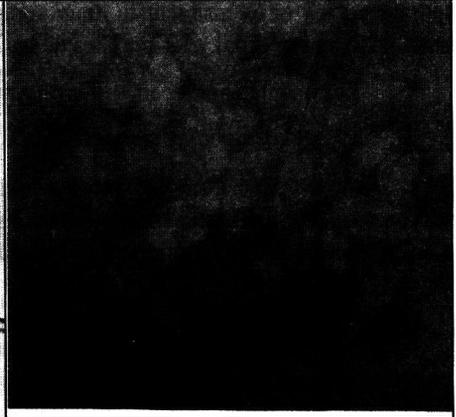


Fig. 8- Manto poligonal de las micorrizas de tipo AD. x1000.

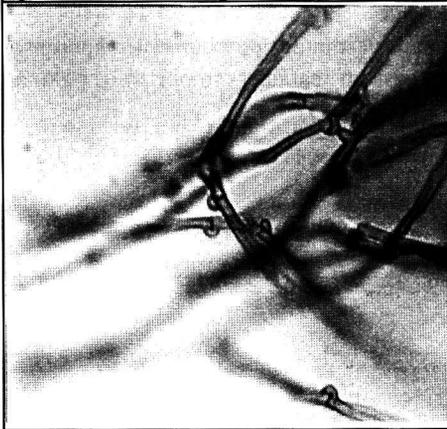


Fig. 9- Detalle de hifas de micorriza de tipo *Hymenogaster*: filulas y ramificación en ángulo recto. x1000.

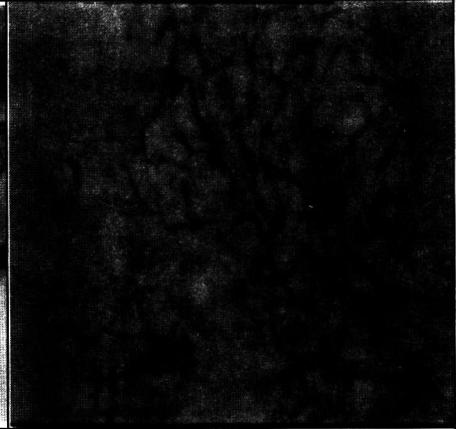


Fig. 10 Manto poligonal de la micorriza de *Hymenogaster citrinus* Vitt. x1000.

2.1. Micorrizas tipo AD.

2.1.1. Caracteres morfológicos. Se trata de una micorriza macroscópicamente bastante peluda.



2.1.2. Color. Su color es marrón oscuro.

2.1.3. Superficie de la micoclena. La superficie de la micoclena de este tipo de micorizas es pseudoparenquimática con aspecto poligonal muy marcado. (fig.8)

2.1.4. Ornamentación. Se caracteriza por tener muchas espinas ramificadas muchas veces en ángulo recto, de ahí su nombre dado por los autores franceses ("angle droit") (fig. 7).

Se trata de una micorriza muy frecuentemente señalada en las trufas por los franceses aunque se ignora cuál es la especie responsable, pudiendo ser varios hongos los que forman este tipo de micorizas.

Su presencia no impide la producción, pero se trata de un hongo más competitivo que la trufa, por lo que es temible en vivero, ya que si esta micorriza va desde vivero, luego se instala en campo. Es un hongo que puede provocar quemado, con la consiguiente "falsa esperanza" que esto puede provocar en el agricultor al creer que se están produciendo trufas.

2.2. Micorizas formadas por hongos Basidiomycotina.

En general se reconocen por la presencia de bucles en las hifas.

Dentro de las micorizas encontradas hay varias formadas por hongos Basidiomycotina cuya especie no se ha reconocido.

De todas las encontradas destacamos la aparición de micorizas tipo *Hymenogaster citrinus* Vitt. (DONINI & BENCIVENGA, 1995)

2.2.1. *Hymenogaster cf. citrinus* Vitt.

2.2.1.1. Caracteres morfológicos. Esta especie presenta una forma linear-alargada.

2.2.1.2. Color. Su color es marrón oscuro a negro.

2.2.1.3. Superficie de la micoclena. La superficie de la micoclena es pseudoparenquimática y poligonal con células isodiamétricas. (Fig. 10)

2.2.1.4. Ornamentación. Caracterizada por las hifas ramificadas en ángulo recto con fibulas (o bucles) (Fig. 9), es una micorriza muy oscura y peluda a la lupa. Aparentemente puede confundirse con las de tipo AD pero las fibulas nos indican que es un Basidiomycotina. (DONINI & BENCIVENGA, 1995).



3. "Otros".

Como resultado de las observaciones se han podido detectar diversas estructuras que no son micorrizas propiamente, sino micelios, conidios, u otras formaciones indeterminadas en muchas ocasiones. Por tanto, en el grupo denominado "otros" se engloban todas estas peculiaridades.

III. RESULTADOS DE LOS MUESTREOS Y ANÁLISIS.

Como ya se ha indicado, se realizaron muestreos durante la primavera y el otoño, de la forma anteriormente descrita. Se trataba de recolectar raíces de los árboles marcados. Para ello se tienen 5 avellanos (**A**), 5 robles (**R**), y 5 encinas (**E**) con cada uno de los tratamientos de acolchado con paja (**PJ**); acolchado con plástico (**PL**), o sin tratamiento o testigo (**T**).

Se expresa el resultado en porcentaje resultante de la frecuencia que se obtiene de indicar el número de veces que se ha observado un tipo de micorriza respecto al número de árboles muestreados de cada especie (avellano, roble, encina) con cada tratamiento.

A continuación se incluye la tabla resumen de los cuatro muestreos efectuados hasta el momento (Tabla 3), indicando en forma de porcentaje el número de veces que se ha observado cada especie o tipo de micorriza, respecto al número de árboles muestreados.

Tabla 3.- Resumen de los cuatro muestreos. Porcentaje de árboles muestreados que presentan cada tipo de micorriza.

PRIMAVERA 96									
	T.mel	T.br.	T.al	T.ruf	T.aest.	AD	Tipo Tuber	Basidio	Otros
AT	100.0	0	0	20.0	0	0	0	0	0
APJ	50.0	50.0	0	0	0	0	0	0	0
APL	100	20.0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL A	85.7	21.4	0	7.1	0	0	0	0	0
RT	20.0	80.0	40.0	0	0	100.0	20.0	0	0
RPJ	0	33.3	33.3	0	0	66.7	0	0	0
RPL	0	100.0	0	0	0	100.0	50.0	0	0
TOTAL R	10.0	70.0	30.0	0	0	90.0	20.0	0	0
ET	50.0	25.0	0	25.0	0	75.0	25.0	0	0
EPJ	20.0	20.0	20.0	0	0	60.0	0	0	0
EPL	25.0	25.0	0	0	0	0	75.0	25.0	0
TOTAL E	30.8	23.1	7.7	7.7	0	46.2	30.8	7.7	0
TOTAL	45.9	35.1	10.8	5.4	0	40.5	16.2	2.7	0
OTOÑO 96									
	T.mel	T.br.	T.al	T.ruf	T.aest.	AD	Tipo Tuber	Basidio	Otros
AT	100.0	0	0	0	0	0	0	0	0
APJ	60.0	40.0	0	0	0	0	0	0	0
APL	100.0	60.0	0	20.0	0	0	0	0	0
TOTAL A	86.7	33.3	0	6.7	0	0	0	0	0
RT	0	100.0	0	0	0	0	0	0	0
RPJ	0	100.0	25.0	0	0	50.0	0	0	0
RPL	0	100.0	0	66.7	0	100.0	0	0	0
TOTAL R	0	100.0	12.5	25.0	0	50.0	0	0	0
ET	50.0	50.0	50.0	50.0	0	50.0	0	0	0
EPJ	33.3	0	0	100.0	0	100.0	33.3	0	33.3
EPL	33.3	33.3	33.3	33.3	0	33.3	33.3	0	0
TOTAL E	37.5	25.0	25.0	62.5	0	62.5	25.0	0	12.5
TOTAL	51.6	48.4	9.7	25.8	0	29.0	6.5	0	3.2



Tabla 3.- (Cont.)

PRIMAVERA 97									
	T.mel	T.br.	T.al	T.ruf	T.aest.	AD	Tipo Tuber	Basidio	Otros
AT	100.0	0	0	0	0	0	0	33.3	0
APJ	100.0	0	0	33.3	0	0	33.3	0	0
APL	100.	50.0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL A	100.0	12.5	0	12.5	0	0	12.5	12.5	0
RT	0	100.0	100.0	0	0	0	0	0	0
RPJ	0	100.0	50.0	0	0	75.0	0	0	0
RPL	0	66.7	66.7	0	0	33.3	66.7	0	33.3
TOTAL R	0	87.5	62.5	0	0	50.0	25.0	0	12.5
ET	25.0	25.0	0	0	0	75.5	0	0	25.0
EPJ	25.0	25.0	0	0	0	50.0	75.0	0	25.0
EPL	66.7	33.3	0	66.7	0	33.3	100.0	0	0
TOTAL E	36.4	27.3	0	18.2	0	54.5	54.5	0	18.2
TOTAL	44.4	40.7	18.5	11.1	0	37.0	33.3	3.7	11.1
OTOÑO 97									
	T.mel	T.br.	T.al	T.ruf	T.aest.	AD	Tipo Tuber	Basidio	Otros
AT	80.0	0	0	20.0	0	0	40.0	0	0
APJ	60.0	40.0	0	0	0	0	0	0	40.0
APL	80.0	20.0	0	20.0	20.0	0	0	0	0
TOTAL A	73.3	20.	0	13.3	6.7	0	13.3	0	13.3
RT	0	80.0	0	40.0	0	80.0	40.0	0	0
RPJ	0	100.0	0	0	0	80.0	40.0	0	20.0
RPL	0	80.0	20.0	0	0	60.0	40.0	0	40.0
TOTAL R	0	86.7	6.7	0.13.3	0	73.3	40.0	0	20.0
ET	40.0	20.0	20.0	0	0	80.0	20.0	0	0
EPJ	60.0	40.0	0	20.0	0	80.0	40.0	20.0	60.0
EPL	60.0	20.0	0	0	0	40.0	40.0	0	0
TOTAL E	53.3	26.7	6.7	6.7	0	66.7	33.3	6.7	20.0
TOTAL	42.2	44.4	4.4	11.1	2.2	46.7	28.9	2.2	17.8

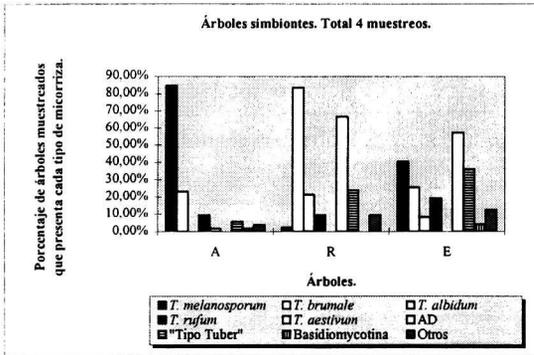
1. Resultados por árboles simbiotes en el conjunto de los cuatro muestreos.

A la luz de la tabla 4 y del gráfico 1, podemos analizar la presencia de *Tuber melanosporum* y otros tipos de micorrizas en los diferentes árboles simbiotes en el conjunto de los cuatro muestreos.

Tabla 4.- Porcentaje de árboles muestreados que presenta cada tipo de micorriza según los simbiotes arbóreos. Total de los 4 muestreos.

	AVELLANO	ROBLE	ENCINA
<i>T. melanosporum</i>	84.62	2.38	40.43
<i>T. brumale</i>	23.08	83.33	25.53
<i>T. albidum</i>	0.00	21.43	8.51
<i>T. rufum</i>	9.62	9.52	19.15
<i>T. aestivum</i>	1.92	0.00	0.00
AD	0.00	66.67	57.45
Tipo Tuber	5.77	23.81	36.17
Basidiomycotina	1.92	0.00	4.26
Otros.	3.85	9.52	12.77

Gráfico 1.- Porcentaje de árboles muestreados que presentan cada tipo de micorriza según simbiotes arbóreos. Total de los 4 muestreos.



En los **avellanos** destaca la buena micorrización, ya que un 84'62 % de los árboles muestreados presentaban *Tuber melanosporum*, frente al 2'38 % de los robles y el 40'43 % de las encinas. *T. brumale* es la especie que le sigue en porcentaje pero muy por debajo.

Es destacable que los avellanos no presentan contaminación tipo AD, la cual en robles y encinas representa el 60'67% y el 57'45 % de los árboles muestreados respectivamente.



En **roble** destaca el alto grado de micorrización por *T. brumale* que es prácticamente igual que el de los avellanos para *T. melanosporum*.

Las **encinas** tienen una micorrización por *T. melanosporum* aceptable. En esta especie las contaminaciones aparecen igualmente representadas, aunque sobresalen algo las micorrizas de tipo AD. Por el contrario, sí que podemos decir que la diversidad de tipo de micorrizas encontrados en encinas es mayor que en los otros árboles, y además se aprecia que es mayor en otoño.

Cabe destacar, en encinas, el alto porcentaje de micorrizas denominadas de “tipo *Tuber*”. Esto es comprensible si tenemos en cuenta las especiales características del sistema radical de las encinas, ya descritas anteriormente.

Nos llama la atención el mayor porcentaje de encinas, respecto a los avellanos y robles en las que aparecen hongos Basidiomycotina. También el apartado denominado “otros” se encuentra más representado entre las encinas.

A la vista de estos datos la encina es el árbol que más tipos de micorrizas presenta (gráfico 1).

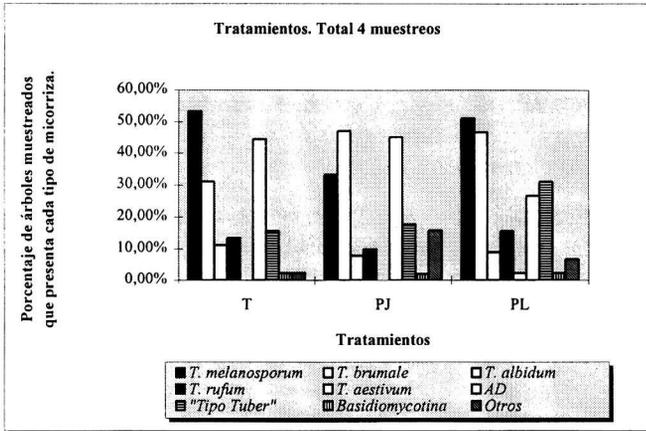
2. Resultado del conjunto de los 4 muestreos por tratamientos.

A continuación pasamos a analizar los resultados fijándonos en los diferentes tratamientos de acolchado aplicados a los árboles. Explicamos los resultados en porcentaje resultante de señalar el número de árboles que presenta cada tipo de micorriza, respecto al número total de ejemplares con cada tratamiento recolectados.

Tabla 5.- Porcentaje de árboles muestreados que presentan cada tipo de micorriza según tratamientos. Total 4 muestreos

	TESTIGO	PAJA	PLÁSTICO
<i>T. melanosporum</i>	53.33	33.33	51.11
<i>T. brumale</i>	31.11	47.06	46.67
<i>T. albidum</i>	11.11	7.84	8.89
<i>T. rufum</i>	13.33	9.80	15.56
<i>T. aestivum</i>	0.00	0.00	2.22
AD	44.44	45.10	26.67
Tipo <i>Tuber</i>	15.56	17.65	31.11
Basidiomycotina	2.22	1.96	2.22
Otros.	2.22	15.69	6.67

Gráfico 2.- Porcentaje de árboles muestreados que presentan cada tipo de micorriza según tratamientos. Total 4 muestreos



En el conjunto de los cuatro muestreos el porcentaje de árboles con micorrizas de *T. melanosporum* es algo más bajo en los árboles que tienen acolchado con paja. (Gráfico 2).

En cuanto a las especies competidoras, destacan por su alta representación *T. brumale* y la de tipo AD.

La contaminación por *Tuber brumale* aparece en mayor número de ejemplares observados de los sometidos acolchado con paja y plástico, mientras que la AD se ha reconocido en el mismo número de árboles muestreados en todos los tipos de tratamientos con menor representación en plástico.

Lo más llamativo es el alto porcentaje de árboles con acolchado de paja en los que aparecen estructuras que englobamos en el apartado de "Otros". Debido a la paja aparecen micelios saprofitos, conidios y otras estructuras fúngicas que se han colocado en el apartado de "otros". Por tanto en este apartado, tal como se ha indicado, no tratamos de otras micorrizas sino de otras estructuras, no micorrícicas, que hemos observado en los diferentes ejemplares recolectados.

3. CONTAMINACIONES. EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO.

3.1. Contaminaciones por árboles simbiotes.

Si englobamos todas las micorrizas diferentes de *T. melanosporum* como contaminaciones, y representamos la evolución a lo largo de los 4 muestreos de la presencia de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones, podremos ver si la

micorriza "deseada" se mantiene o tiende a descender o a aumentar con el paso del tiempo.

Expresamos los resultados como porcentaje. Este porcentaje es el resultado de representar el número de árboles en los que aparece *T. melanosporum* respecto al número de árboles muestreados de ese tipo o ese tratamiento, (indicándose cada árbol 1 sola vez, si aparecen varias contaminaciones en el mismo ejemplar, para no contar varias veces el mismo árbol).

Gráfico 3.- Evolución del porcentaje de **avellanos** estudiados que presentan micorrizas de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.

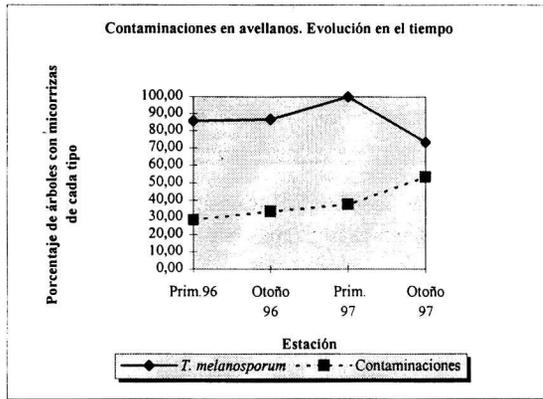


Gráfico 4.- Evolución del porcentaje de **robles** estudiados que presentan micorrizas de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.

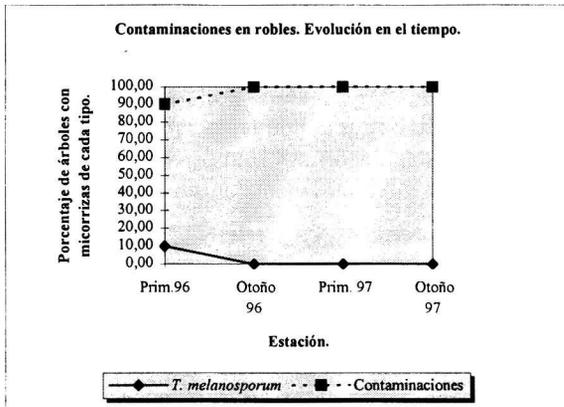
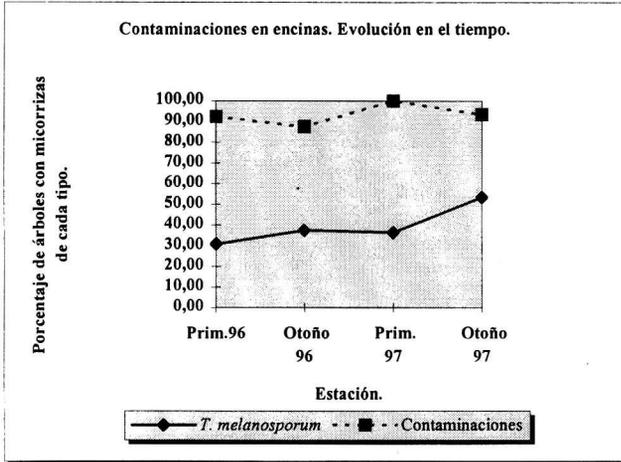


Gráfico 5.- Evolución del porcentaje de **encinas** estudiadas que presentan micorrizas de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.



Si observamos los **avellanos** (gráfico 3), podemos ver cómo el porcentaje de árboles recolectados que presentaba *T. melanosporum* aumenta ligeramente hasta la primavera de 1997 y en otoño del 97 cae, mientras que se aprecia una tendencia al incremento de la presencia de especies competidoras.

Respecto a los **robles** (gráfico 4), el porcentaje de árboles muestreados con micorriza de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones cae rápidamente. Estas micorrizas contaminantes se observan en el 100 % de los ejemplares estudiados desde el otoño del 96.

Las **encinas** (gráfico 5), presentan una tendencia general al ascenso en *T. melanosporum* y en las contaminaciones se observan picos en las primaveras, pero la variación no es excesivamente grande.

Es interesante observar que en robles y encinas, las contaminaciones son mayores, van por encima, que el porcentaje de árboles muestreados que presentan *T. melanosporum*, mientras que en los avellanos ocurre al contrario, siendo *T. melanosporum* más abundante que las especies competidoras.



3.2. Contaminaciones por tratamientos.

Gráfico 6.- Evolución del porcentaje de árboles **testigo** muestreados que presentan *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.

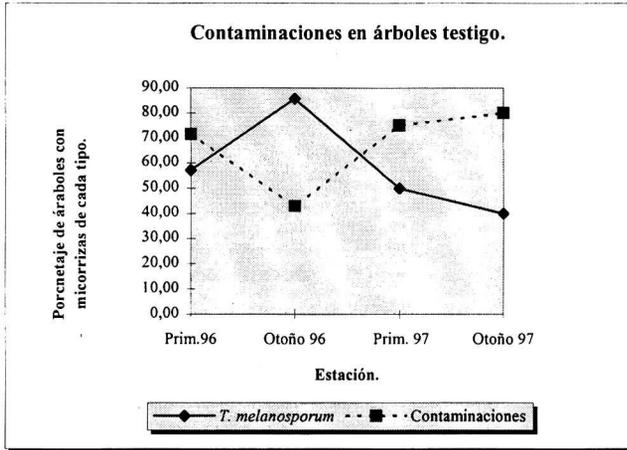


Gráfico7.- Evolución del porcentaje de árboles con cubierta de **paja** muestreados que presentan *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.

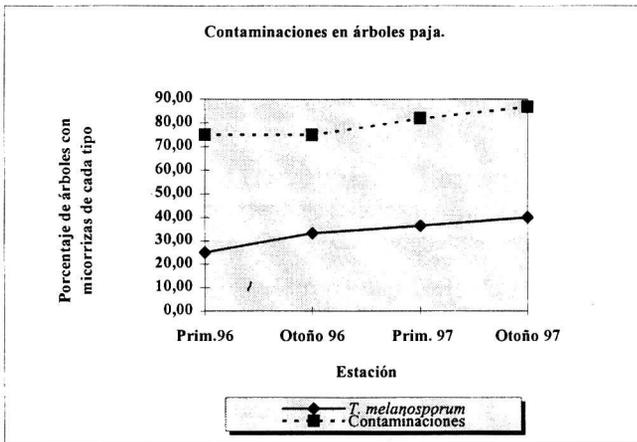
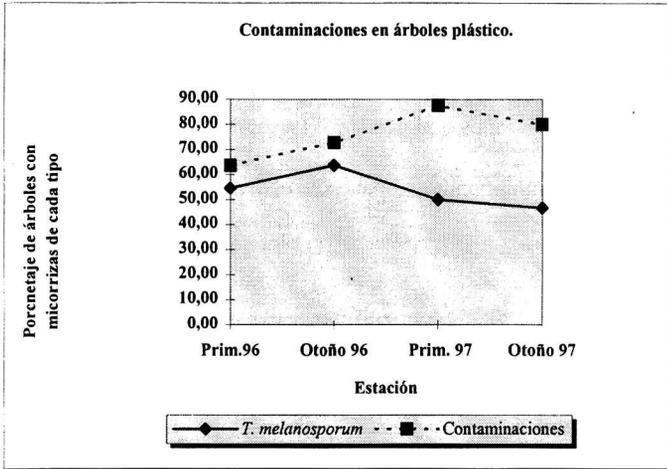


Gráfico 8.- Evolución del porcentaje de árboles con cubierta de **plástico** muestreados que presentan *T. melanosporum* frente a las contaminaciones.



En los diversos tratamientos aplicados en los árboles la tendencia general es el aumento del número de árboles muestreados que presentan contaminaciones.

En los árboles **testigo** (gráfico 6) hay un claro descenso de la presencia de la micorriza de *T. melanosporum* frente a las contaminaciones. Sólo hay mayor presencia de *T. melanosporum* en el otoño de 1996.

En los árboles sometidos a tratamiento de **acolchado con paja** (gráfico 7) las contaminaciones van en aumento y superan a las micorrizas de *Tuber melanosporum*, pero ésta última, al avanzar el tiempo, va aumentando paulatinamente su presencia entre los árboles muestreados.

Observando los árboles cuyo acolchado se hizo con **plástico** (gráfico 8) vemos cómo las contaminaciones superan en todo momento a las micorrizas de *T. melanosporum* aunque decae un poco en el otoño del 97. *T. melanosporum* va apareciendo cada vez menos veces en los ejemplares estudiados, con un pequeño pico en el otoño del 96.

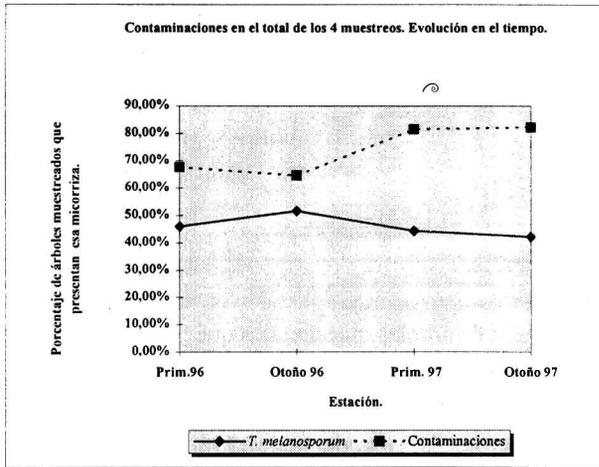
En los árboles con cubierta de paja y plástico, el comportamiento es más regular y sigue una pauta más marcada, mientras que en los árboles sin tratamiento los datos oscilan más y no existe un comportamiento estable.



3.3. Contaminaciones. Totales.

Observando las contaminaciones del total de los 4 muestreos (Gráfico 9) sin tener en cuenta los árboles ni los tratamientos, podemos ver que en general, siempre hay más contaminaciones que *Tuber melanosporum*, y, a excepción del otoño de 1996, en el que bajan las micorrizas competidoras, la tendencia general es al aumento de contaminaciones y al descenso de la presencia de la micorriza "deseada".

Gráfico 9.- Contaminaciones. Evolución en el tiempo. Totales de los 4 muestreos.



4. EVOLUCIÓN DE LAS DIVERSAS ESPECIES DE MICORRIZAS EN EL TIEMPO.

4.1. *Tuber melanosporum*.

En lo que respecta a *T. melanosporum* podemos observar (gráfico 10) cómo en los **avellanos** la tendencia general es hacia el descenso en porcentaje de árboles observados en los que aparece esta especie.

En los **robles**, con una micorrización muy baja, el número de árboles estudiados en los que se observa esa especie, cae drásticamente a lo largo del tiempo en el otoño 96 y estaciones siguientes.

El porcentaje de **encinas** muestreadas en las que se observa *T. melanosporum* aumenta ligeramente en general, y se observa en ellas un incremento en los otoños con caída posterior en la primavera.

En el total de árboles, los avellanos siempre superan y, en bastante, a los demás simbiontes en cuanto al porcentaje de árboles micorrizados con esa especie.

Gráfico 10.- Evolución en el tiempo de la aparición de la micorriza de *Tuber melanosporum*, según los diferentes árboles simbiontes.

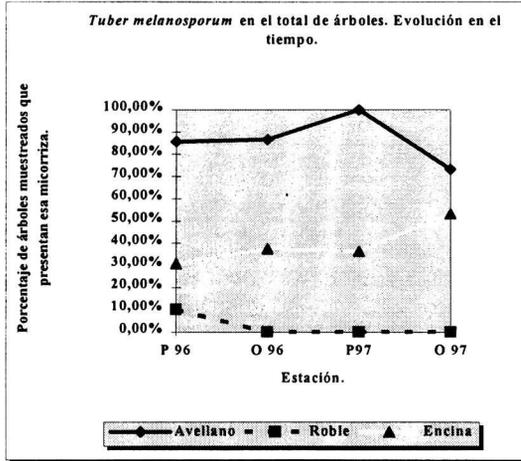
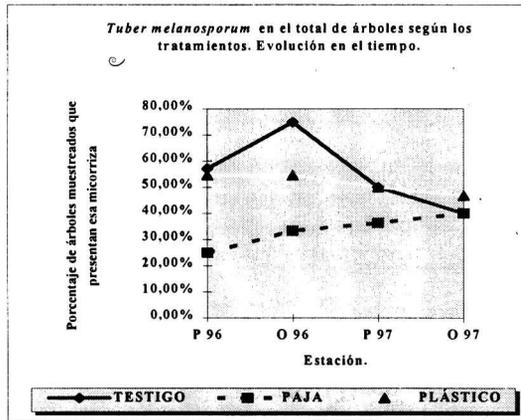


Gráfico 11.- Evolución en el tiempo de la aparición de la micorriza de *Tuber melanosporum*, según los diferentes tratamientos.

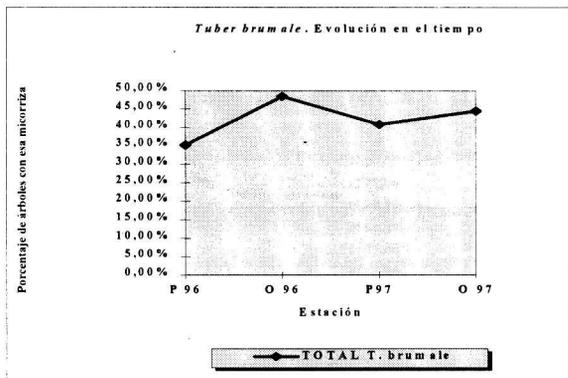


Respecto a los tratamientos (gráfico 11) *T. melanosporum* abunda más en los árboles sin cubierta, o testigos, seguido de los árboles cubiertos de plástico y por último de los que presentan acolchado de paja.



4.2. *Tuber brumale*.

Gráfico 12.- Evolución en el tiempo de la aparición de la micorriza de *Tuber brumale*.



A la luz de la gráfica en la que expresamos la evolución en el tiempo del porcentaje de árboles muestreados en los que aparece *T. brumale* (gráfico 12), observamos unos claros picos en el otoño de los dos años de muestreo. Esto parece indicar que esta especie es más aparente en esta estación y por eso la identificamos mejor.

Respecto al total de árboles (Tabla 3), *T. brumale* aparece en mayor número de robles muestreados siempre, quedando las encinas y avellanos por debajo de esta especie arbórea en cuanto a porcentaje de árboles de los estudiados que presenta micorrizas de *T. brumale*.

4.3. *Tuber albidum*.

Al contrario de lo que ocurre con casi todas las especies, *T. albidum* es una micorriza que aparece sobre todo en las primaveras, así observamos su máxima presencia en la primavera de 1997, en lo que respecta al conjunto de los árboles y de los 4 muestreos (Tabla 3).

4.4. *Tuber rufum*.

Llama la atención el elevado porcentaje de ejemplares muestreados con *Tuber rufum* en el otoño de 1996 (Tabla 3).

4.5. *Tuber aestivum*.

Esta especie fúngica solamente ha sido detectada en un ejemplar de avellano recolectado en otoño de 1997. Se trataba de un avellano con acolchado de plástico.



4.6. Micorriza AD.

La micorriza de tipo AD en el total de los árboles está sufriendo un incremento en su presencia (Tabla 3), ya que excepto en el otoño de 1996, en que bajó, el resto del tiempo ha mantenido un ascenso progresivo.

Si analizamos esta presencia por árboles simbiosntes podemos ver cómo aumenta en los otoños en las encinas.

Esta micorriza, como ya se ha reiterado, no se encuentra en los avellanos.

El porcentaje de presencia de la micorriza AD en los robles cae en el otoño 96 para ascender en el otoño del 97.

4.7. “Tipo *Tuber*”.

Al observar el total de árboles muestreados se ve claramente un descenso en el porcentaje de micorrizas calificadas como “tipo *Tuber*” en los otoños (Tabla 3), coincidiendo con la época en la que otras micorrizas como *Tuber melanosporum* o *T. brumale* aumentan su presencia.

En los otoños se identifican mejor las diferentes especies de micorrizas, por estar éstas mejor desarrolladas. Este hecho es el causante de la disminución, durante el otoño, del porcentaje de presencia del grupo denominado “tipo *Tuber*”, ya que las micorrizas que incluimos en este bloque son aquellas cuya escasa definición de los caracteres diagnósticos hace que no podamos identificar la especie concreta.

Por tanto, hay que tener en cuenta que el grupo denominado “tipo *Tuber*” no es una especie, sino un conjunto de micorrizas pertenecientes a diferentes especies con desarrollo incompleto, y que por consiguiente, no podemos incluir en ninguna categoría concreta hasta que desarrollen del todo, lo cual ocurre en otoño.

4.8. Basidiomycotina.

Los hongos Basidiomycotina aparecen con una mayor frecuencia en las primaveras (Tabla 3), al igual que *T. albidum* y las micorrizas encuadradas dentro de las de “tipo *Tuber*”.

4.9. Otros.

Volvemos a insistir en la diversa naturaleza de las estructuras calificadas y encuadradas dentro de la denominación “otros”, ya que no se trata, en muchos casos de micorrizas sino de conidios, micelio u otras formaciones indeterminadas que aparecieron en las raíces de los árboles muestreados.



Observando la evolución en el tiempo de las diversas estructuras englobadas dentro del apartado de "otros" (Tabla 3), podemos ver la tendencia ascendente que llevan a lo largo del tiempo estas estructuras, si bien, el porcentaje de ejemplares arbóreos estudiados que presentan este tipo de formaciones no es muy alto (máximo 18 %).

Si tenemos en cuenta los tratamientos, los árboles con acolchado de paja presentan mayor número de veces alguna de estas "formas". Les siguen los ejemplares que llevan plástico y aquellos que no tienen ningún tratamiento, quedarían en último lugar.

Con toda seguridad, la paja aporta las condiciones necesarias para que se desarrollen otras especies de hongos responsables de esas estructuras detectadas.

V. CONCLUSIONES.

1.- Se ha realizado el seguimiento de una parcela de experimentación plantada con encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.), robles (*Quercus faginea* Lam.) y avellanos (*Corylus avellana* L.) micorrizados en vivero por *Tuber melanosporum* Vitt. para la obtención de trufa negra. Hasta la entrada en producción de la parcela, las micorrizas son la única fuente de información de la que disponemos sobre el estado del cultivo. Por ello se ha estudiado la evolución de la micorrización de los árboles, con el objeto de comprobar si se mantiene la micorriza inoculada, o bien, si por el contrario, se ha producido el desplazamiento por la entrada de otras especies no deseadas, o competidoras.

2.- En base al estudio de los datos geográficos, geológicos, edáficos, bioclimáticos y de vegetación, realizados en el apartado de material y métodos la parcela elegida para este estudio se encuentra **situada** en Olóriz (Navarra) dentro de la Navarra Media Oriental, en la zona de la Valdorba. Este municipio se localiza a 611 m de altitud y a 24 Km. de Pamplona. Olóriz se sitúa sobre **materiales** del Terciario (Mioceno y Oligoceno). Los **suelos** de esta localidad pertenecen a los Typic-Xerorthent y Calcixerollic-Xerorchrept. El **clima** de Olóriz es Templado oceánico, con termotipo colino y ombrotipo subhúmedo. La **vegetación potencial** de la zona es la correspondiente a la serie *Spiraeo obovatae-Querceto rotundifoliae* S.

3.- Los datos anteriores corroboran la ubicación de la parcela de experimentación en una zona potencialmente trufera.

4.- La parcela, descrita en el capítulo de material y métodos, consta en la actualidad de 217 plantas de las que el 34 % son encinas, el 16 % robles y el 50 % avellanos.



De estos árboles se marcaron 45 (15 avellanos, 15 robles, y 15 encinas), 5 de cada tratamiento agronómico llevado a cabo por el ITGA (de acolchado de paja, plástico y sin acolchado o árboles testigo). Sobre estos 45 ejemplares se ha realizado el seguimiento de la micorrización.

5.- Se ha procedido al muestreo periódico de las raíces de los árboles marcados durante la primavera y el otoño de los años 1996 y 1997.

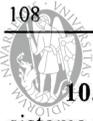
Durante este periodo, se ha realizado el estudio de la evolución de la micorrización en el tiempo, en los diferentes simbiontes arbóreos y en función de los diversos tratamientos de acolchado aplicados a los árboles, con el fin de observar la influencia de estos factores sobre el desarrollo de la trufa.

6.- Como fruto del estudio de las micorrizas se ha identificado *Tuber melanosporum*, además de otras especies denominadas competidoras o contaminaciones como son: *Tuber aestivum*, *Tuber brumale*, *T. albidum*, *T. rufum*, así como las de tipo AD, algunos hongos Basidiomycotina y otras estructuras fúngicas que hemos encuadrado en el apartado "otros". Algunas micorrizas, por no presentar bien definidos sus caracteres diagnósticos, se han encuadrado dentro de las denominadas "tipo *Tuber*". Se ha realizado un catálogo con descripciones y material fotográfico, de las especies reconocidas en la parcela a lo largo de los dos años de muestreo.

7.- Se han analizado los datos obtenidos a partir de las micorrizas identificadas. El análisis se ha hecho en función de los simbiontes arbóreos, los tratamientos, respecto a las contaminaciones en su conjunto y la evolución de las distintas especies y tipos de micorrizas a lo largo del tiempo.

8.- En el análisis de las micorrizas según los **simbiontes arbóreos** destacamos el **avellano** como la especie en la que mejor se mantiene la micorrización por *Tuber melanosporum*. Por otro lado los **robles** son los árboles que peor mantienen la micorrización, como queda reflejado en el hecho de que a partir de otoño del 96, no se ha encontrado *Tuber melanosporum* en ningún roble. Las **encinas** continúan micorrizadas, y la presencia de la micorriza de *T. melanosporum* mantiene un ligero aumento a lo largo de los muestreos.

9.- Estas diferencias entre los simbiontes arbóreos, con distinta procedencia en cuanto a empresa suministradora, nos llevan a concluir que los robles no fueron micorrizados correctamente en el vivero. Esto queda también corroborado por la presencia de la micorriza de *T. brumale* en los robles en un porcentaje de árboles muestreados similar al que presentan los avellanos para *T. melanosporum*.



10.- Las micorrizas de tipo AD se revelan como un tipo muy representado en el sistema radical, tanto en encinas (57'45%) como en robles (66'67 %) en porcentaje del conjunto de árboles estudiados. Por el contrario, este tipo de micorriza no ha sido observado nunca en avellanos.

11.- En lo que respecta a los **tratamientos**, en árboles **testigo**, sin ningún acolchado, la micorriza de *T. melanosporum* es la más frecuente. En árboles con acolchado de **paja** la micorriza más abundante es la de *T. brumale*. En los árboles con recubrimiento de **plástico**, la frecuencia de aparición de especies es similar para *T. brumale* y *T. melanosporum*, siendo estas especies las más representadas en los ejemplares estudiados. Además *T. brumale* se ve favorecida por el uso de acolchado de paja o plástico respecto a no tener ningún tratamiento.

Por otro lado se ha observado que la presencia de *T. melanosporum* en árboles testigo es mayor que en los árboles sometidos a tratamientos de acolchado. Al contrario de lo esperado, la paja y el plástico no parecen favorecer el desarrollo de *T. melanosporum*, mientras que parecen favorecer otras especies competidoras.

Dado que estos datos se refieren sólo a dos años de muestreo habrá que esperar a posteriores muestreos que nos permitan observar la influencia de los diversos tratamientos.

Los árboles sometidos a tratamiento de paja presentan más frecuentemente estructuras denominadas "otros tipos" que no son micorrizas sino también conidios, micelios y otras estructuras de hongos saprofitos encontradas en las raíces y favorecidas por la paja.

12.- Respecto a las especies que se califican de **contaminaciones** o especies competidoras, analizadas en su conjunto se ha comprobado que:

12.1.- En el conjunto de árboles de los cuatro muestreos, estas especies están aumentando su presencia a lo largo del tiempo debido al avance de las micorrizas naturales y su implantación en la parcela.

12.2.- Los **avellanos** son los únicos árboles cuyo porcentaje de aparición de contaminaciones es inferior al de presencia de *T. melanosporum*.

12.3.- En las **encinas** aunque el número de árboles en los que observamos especies de micorrizas competidoras es mayor que el número de árboles en los que se identifica *T. melanosporum*, éstas últimas micorrizas mantienen un ligero ascenso, es decir, año a año las encinas se van adaptando a la parcela.

12.4.- Como ya se ha indicado, a partir del otoño de 1996 en los **robles** sólo se han detectado micorrizas contaminantes.

13.- Atendiendo a la **evolución temporal de las diversas especies o tipos micorrícicos** se ha percibido que:

13.1.- El **otoño** es el periodo más favorable al desarrollo completo de las micorrizas de *T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. rufum*, y las de tipo AD. Por otro lado en **primavera** se encuentran en mayor actividad *T. albidum*, y las micorrizas formadas por hongos Basidiomycotina.

13.2.- El otoño es la mejor época para los muestreos puesto que se identifican las especies con mayor facilidad, ya que durante esta estación presentan sus caracteres diagnósticos más desarrollados. En primavera, gran parte de las micorrizas, no han completado su desarrollo y las características están poco definidas por lo que únicamente las catalogamos como "tipo *Tuber*".

14.- En relación con el **aspecto práctico** del análisis de los datos, encaminado a una **truficultura racional**, podemos afirmar que:

14.1.- En esta parcela, los avellanos son los árboles que se muestran más idóneos, seguidos de las encinas.

Ante la brusca desaparición de *Tuber melanosporum* de las raíces de los robles podemos asegurar que la micorrización del vivero no fue la idónea para su uso en **truficultura**.

14.2.- *Tuber melanosporum* aparece en mayor porcentaje en árboles testigo que en árboles sometidos a tratamientos de acolchado.

15.- A la espera de obtener cuerpos fructíferos en esta parcela, no podemos concluir sobre la efectividad de los tratamientos en la **producción de trufas**. Por ello se va a continuar con el estudio para disponer de más datos que nos informen sobre la tendencia de la micorrización hasta la obtención de carpóforos.

En el futuro, la producción nos indicará qué simbionte arbóreo y qué tratamientos son los más adecuados para el cultivo de la **trufa negra**.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- AGERER, R. (1987-96). *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag. Eduard Dietenberger. Munich.
- ALLEN, M.F. (1989). Mycorrhizae and rehabilitation of disturbed arid soils: processes and practices. *Arid Soil Research* (1989) 3: 229-241.
- ALLEN, M.F. (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press. Cambridge. New York. Port Chester. Melbourne. Sydney. 184 pp.
- BARDET, M.C. (1995) Truffe. Les conditions de culture. *Infos Ctifl*. 116: 41-43.

- BARDET, M.C., FRESQUET, C. CTIFL (1995) Production de truffes. Influence de la pluviométrie et de la température du sol. *Infos (Paris)* (1995) **110**: 38-42.
- BAREA, J.M., HONRUBIA, M. (1993). Micorrizas y revegetación. *Ecosistemas* (1993) **4**: 46-47.
- BAREA, J.M., REQUENA, N. (1994). Recuperación de espacios degradados en ambientes mediterráneos: elección de especies, propagación y establecimiento de las plantas. En: *Propagación vegetal: el reto de las nuevas técnicas frente a los problemas actuales*. (Socias, R. et al. eds. ITEA, Zaragoza) pp 297-326.
- BENCIVENGA, M., CALANDRA, R., GRANETTI, B. (1990) Recherche sui terreni e sulla flora delle tartufaie naturali di *Tuber melanosporum* Vitt. dell' Italia Centrale. En: *Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo*. (Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano, Spoleto, eds.) Spoleto (1988): 337-374.
- BENCIVENGA, M., GRANETTI, B. (1990). Flora vegetazione e natura dei terreni di alcune tartufaie naturali di *Tuber magnatum* Pico dell' Italia Centrale. En: *Atti del 2° Congresso Internazionale sul tartufo*. (Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano, Spoleto, eds.) Spoleto (1988): 415-131.
- BENCIVENGA, M., DONINI, D., DI MASSIMO, G. (1992). Analisi delle micorrize in una tartufaia coltivata di *Tuber melanosporum* undici anni dopo l'impianto. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* (1992) **7**: 159-171.
- BENCIVENGA, M., DI MASSIMO, G., DONINI, D., TANFULLI, M. (1995). micorrize inquinanti frecuente nelle piante tartufigene. Nota I - Inquinanti in vivaio. *Micologia Italiana* (1995) **2**: 167-178.
- BERBEE, M.L., TAYLOR, J.M. (1993). Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.* (1983) **71**: 1114-1127.
- BONFANTE, P., FONTANA, A., MONTACCHINI, F. (1971). Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. I. Dimostrazione di un effetto fitotossico. *Allionia* (1971) **7**: 47-54.
- BRAGATO, G. (1997). Modificazioni indotte dal tartufo nero pregiato (*Tuber melanosporum* Vitt.) sulla struttura e sulla sostanza organica del suolo. *Monti e Boschi* (1997) **1**: 23-27.
- BRAGATO, G., GARDIN, L., LULLI, L., PANINI, T., PRIMAVERA, F. (1992). I suoli delle tartufaie naturali della zona di San Miniato (Pisa). *Monti e Boschi* (1992) **2**: 17-24.
- CALONGE, F.D. (1990). Taxonomy of truffles. *Atti del 2° Congresso Internazionale sul tartufo*. Spoleto. 24-27 Novembre 1988: 31-35.
- CALLOT, G., JAILLARD, B. (1996). Effect of structural characteristics of subsoil on the fruitbodies of *Tuber melanosporum* and other mycorrhizal fungi. *Agronomie*. (1990) **17** (7): 401-419.
- CARTIÉ, G., PALAZÓN, C., BARRIUSO, J., DELGADO, I. (1996). Un nuevo método de inoculación de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt. *Ciencia y Técnica* (1996) **46**: 40-43.
- CUDLIN, P., CHMELICKOVA, E. (1996). Degradation and restoration processes in crowns and fine roots of polluted montane Norway spruce ecosystems. *Phyton-Annales Rei Botanicae*. (1996) **36** (3): 69-76.
- CHANWAY, C.P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *Forest Science*. (1997) **43** (1): 99-112.

- CHATIN, A.D., (1892). *La truffe*. Paris.
- CHEVALIER, G., POIOU, N. (1990). Study of important factors affecting the mycorrhizae development of the truffle fungus in the field using plants inoculated in nurseries. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. (1990) **28 (1-4)**: 75-77.
- DELMAS, J. (1978). *Tuber* spp. En: *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Chang & Hayes eds. pp. 645-680.
- DÍAZ, G., HONRUBIA, M., (1994) An Mycorrhizal survey of plants growing on mine wastes in southeast Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation* (1994) **8**: 59-68.
- DÍAZ, G., HONRUBIA, M. (1995). Effect of native and introduced arbuscular fungi on growth and nutrient uptake of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Biologia Plantarum* (1995) **37 (1)**: 121-129.
- DONINI, D. & BENCIVENGA, M. (1995). Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene. Nota 2- Inquinanti in campo. *Micologia Italiana* (1995) **2**: 185-207.
- ELÍAS CASTILLO, F., RUIZ BELTRÁN, L. (1986) *Caracterización agroclimática de Navarra*. Madrid. Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes del Gobierno de Navarra. Madrid. Pamplona. 226 pp.
- FITE, F. (1962). La trufa en España. *Boletín Informativo de la Asociación Benéfica Forestal*. Madrid mayo-junio (1962) **70**: 15-17.
- FONTANA, A., CERUTI, A., MEOTTO, F. (1992). Criteri istologici per il riconoscimento delle micorrize di *Tuber albidum*. *Micologia e Vegetazione Mediterranea*. (1992) **7 (1)**: 121-136.
- GARCÍA, J. (1991). Truficultura: sus perspectivas. *El Campo* (1991) **119**: 67-69.
- GARCÍA ROLLÁN, M. (1987). *Cultivo de setas y trufas*. Ed. Mundiprensa. Madrid. 174 pp.
- GIRAUD, M. (1988). Prèlevement et analyse de mycorrhizae. En: *La truffe*. CTIFL, 1988 n° 10. Ed. Charles Parra: 67-69.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J., MORENO-ARROYO, B. (1995). Contribución al conocimiento del género *Tuber* (Micheli ex Wiggers: Fr.) en la provincia de Jaén. *Lactarius* (1995) **4**: 40-46.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J., MORENO-ARROYO, B. (1996). El cultivo de la trufa negra en la provincia de Jaén. *Lactarius Boletín de la Sociedad Micológica. Herbario. Jaén. Fac. de Ciencias Experimentales*. (1996) **5**: 91-98.
- GRANETTI, B. (1994). Ricerche sulle micorrize di tartufo e controllo delle piante tartufigene. *Giorn. Bot. Ital.* (1994): 19-30.
- GRANETTI, B. (1995). Caratteristiche morfologiche, biometriche e strutturali delle micorrize di *Tuber* di interesse economico. *Micologia Italiana*. (1995) **2**: 101-117.
- GRANETTI, B., RUBINI, A., ANGELINI, P. (1995a) Analisi comparativa morfo-biometrico e strutturale delle micorrizae di *tuber aestivum* Vitt con alcune piante forestali. *Mic. Ital.* (1995) **2**: 48-63.
- GRANETTI, B., RUBINI, A., ANGELINI, P. (1995b) Morfologia e struttura delle micorrize di *Tuber magnatum* Pico e *Tuber borchii* Vitt. con *Tilia platyphyllos* Scop. *Micol. Ital.* (1995) **2**: 27-234.
- GRANETTI, B., RUBINI, A., ANGELINI, P. (1995c). Un parametro biometrico idoneo alla caratterizzazione delle micorrize di *Tuber borchii* Vitt. e di *Tuber magnatum* Pico. *Micol Ital.* (1995) **2**: 17-23.

- GREGORI, G. L., LO BUE, G., MAGGIOROTTO, G. (1990) Caratterizzazione di ectomicorrize in tartufo naturali e di impianto e valutazione della loro competitività nei confronti di *Tuber magnatum*. En: *Atti del Secondo congresso Internazionale sul Tartufo*. (Comunità Montana dei Monti Martani e del serano, Spoleto, eds.) Spoleto, 24-27 novembre 1988: 219-246.
- GREUTE, J. (1974). *Perspectives pour une trufficulture moderne*. Avec la collaboration de J. Delmas. 3^{me} Edition, revue et complétée par l'auteur. Clermont Ferrand INRA. Stn. Pathol. Veg. 65 pp.
- HARLEY, J. L., HARLEY, E. L. (Coatuor). (1987) *A check-list of mycorrhiza in the British flora*. En: *New Phytologist*. London (1987) **105** (2). Suppl.
- ÍÑIGUEZ, J., VAL, R., SÁNCHEZ-CARPINTERO, I., ROMEO, A., MUNILLA, C. (1982). *Mapa de suelos de Navarra*. E: 1:50000. Hoja 173. Tafalla. Departamento de Edafología. Universidad de Navarra.
- JOHNSON, C.N. (1996). Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology & Evolution* (1996) **11** (12): 503-507.
- JOHNSON, C.N. (1997). Fire and habitat management for a mycophagous marsupial, the Tasmanian bettong *Bettongia gaimardi*. *Australian Journal of Ecology* (1997). **22** (1): 101-105.
- KROPP, BR., LANGLOIS, CG. (1990). Ectomycorrhizas in reforestation. *Can J. For. Res.* **20**: 438-451.
- LOIDI, J., BASCONES, J.C., (1995). *Memoria del mapa de Series de Vegetación de Navarra*. E: 1:200000. Gobierno de Navarra. 99 pp.
- LÓPEZ CONTINI, E., (1990). *Cultivo del champiñón, la trufa y otros hongos*. Biblioteca agrícola AEDOS. 132 pp.
- LULLI, L., PANINI, T., BRAGATO, G., GARDIN, L., PRIMAVERA, F. (1991). I suoli delle tartufo naturali delle Crete Senesi. *Monti e Boschi* (1991) **5**: 31-39.
- MAMOUN, M., OLIVER, J. M. (1997). Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum*. Effect of soil disinfection and co-culture with *Festuca ovina*. *Plant and soil* (1997) **188** (2): 221-226.
- MANOZZI-TORINI, L. (1991). *Il tartufo e la sua coltivazione*. Edagricole Edizioni agricole. Bologna. 104 pp.
- MANSO, L. (1991). La trufa como alternativa de cultivo en Álava. *Sustrai* **22**: 48-49.
- MARKS & KOZLOWSKI. (1973). *Ectomycorrhizae*. Academic press. New York & London. 444pp.
- MARTÍNEZ DE AZAGRA, A., GRIGELMO, C. (1991). Implantación de trufas. *Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación*. Hoja nº **12/91 HD**. 23pp.
- MAURI, P.V., GARCÍA, G., FRENÁDEZ-GALIANO, E. (1997). Propagación vegetativa de especies micorrizables con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) Madrid. *Boletín Agrario*. (1997) **5**: 8-12.
- MEOTTO, F., PELLEGRINO, S., CRADDOCK, J.H. (1994). Funghi ectomicorizici del castagno con particolare riferimento ai funghi eduli. *Italus Hortus* (1994) **1** (2): 58-64.

- MEOTTO, F., NOSENZO, C., FONTANA, A. (1995). Le micorrize delle specie pregiate di *Tuber*. *L'Informatore Agrario* (1995) **LI (31)**: 41-45.
- MIGUEL, A.M., SÁEZ, R. (1997). Aspectos sobre truficultura en Navarra (España). *Publicaciones de Biología. Universidad de Navarra. Serie Botánica*. (1997) **10**: 3-9.
- MIRABELLA, A. LULLI, L., PRIMAVERA, F. (1993) Caratteristiche fisico-chimiche e mineralogiche di alcune tartufoie di *Tuber melanosporum* sulla scaglia rossa di Volperino (Perugia). *Micologia e Vegetazione Mediterranea* **8 (2)**: 125-136.
- MONTACCHINI, F., FASOLO-BONFANTE, P., FONTANA, A. (1972). Inibitori naturali della germinazione. Un esempio: *Tuber melanosporum* Vitt. *Informatore Botanico Italiano* (1972) **4**: 156-159.
- MONTACCHINI, F., CARAMIELLO LOMAGNO, R. (1977). Studi sull' ecologia del *Tuber melanosporum* II Azione inibitrice su specie erbacee della flora spontanea. *Allionia* (1977) **22**: 81-85.
- MONTACCHINI, F., LO BUE, G., CARAMIELLO LOMAGNO, R. (1977). Studi sull' ecologia del *Tuber melanosporum*. III Fenomeni di inibizione nell' ambiente naturale nell' Italia centrale. *Allionia* (1977) **22**: 87-104.
- NICOLÁS, J.J. (1973). La trufa. *Boletín de la Estación Central de Ecología* n° 3. 28pp.
- O'DONELL, K.O., CISELNIK, E., WEBER, N.S., TRAPPE, J.M. (1997). Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* (1997) **89 (1)**: 48-65.
- ORIA DE RUEDA, J. A. (1989). Selvicultura y ordenación de montes productores de hongos micorrizógenos comestibles. *Bol. Soc. Micol. Madrid* **13** : 175-188.
- PACIONI, G. (1987). *El cultivo moderno y rentable de la trufa*. Ed.. De Vecchi. Barcelona. 127 pp.
- PALENZONA, M. (1969). Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Corylus avellana*. *Allionia* (1969) **15**: 121-131.
- PALENZONA, M., CHEVALIER, G., FONTANA, A., (1972). Sintesi micorrizica tra i miceli in coltura di *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, *T. rufum* e semenzali di coniferi e latifolie. *Allionia* (1972) **18**: 41-52.
- PANINI, T. , BRAGATO, G., GARDINI, L., LULLI, L., PRIMAVERA, F. (1991) Suoli e siti tartufigeni di un versante tipico delle zone di S. Miniato in Toscana. *L'Italia Forestale e Montana* (1991) **5**: 373-393.
- PANINI, T., LULLI, L., BRAGATO, G., PAGLIAI, M., PRIMAVERA, F. (1993). Suoli e siti del *Tuber melanosporum* Vitt. sulla scaglia rossa di Volperino (PG). *Monti e Boschi* (1993) **2**: 28-33.
- PAPA, G. (1980-81). Purification of inhibitory principle of *Tuber melanosporum* Vitt. *Allionia* (1980-81) **24**: 125-126.
- PAPA, G., PORRARO, G. (1978-79). Studi sull' ecologia del *Tuber melanosporum* Vitt. Analisi spettrofotometriche di estratti di terreni tartufigeni ed azione inibente la germinazione. *Allionia* (1978-79) **23**: 95-102.
- PAPA, G., BORTOLO, R., CASSANI, G. (1992). Componenti di *Tuber melanosporum* con attività fitotossica. *Mic. e Veg. Medit.* (1992) **7 (1)**: 109-110.

- PEGLER, D.N. SPOONER, B.M. (coautor), YOUNG, T.W.K. (coautor). (1993). *British truffles: a revision of British Hypogeous fungi*. Royal Botanical Gardens. Kew. 1993. 216pp.
- PLATTNER, I., HALL, I. R. (1995). Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological Research* (1995) **99** (11): 1367-1370.
- QUINTANA, A. (1992). La truficultura como modalidad agraria en Álava. *Sustrai* **26**: 27-28.
- RAUSCHER, T., AGERER, R., CHEVALIER, G. (1995). Ektomykorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. *Nova Hedwigia* (1995) **61** (3-4): 281-322.
- REYNA, S. (1992). *La trufa*. Agroguias Mundi-presnsa. Madrid. 120 pp.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. (1987). *Memoria del mapa de series de Vegetación De España 1: 400000*. ICONA, 268pp.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. (1995). Clasificación bioclimática de la Tierra. *Folia Botanica Matritiensis*. (1995) **16**: 1-25.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. (1996). *Geobotánica y bioclimatología*. Discurso del Acto de Investidura como Doctor Honoris Causa. Universidad de Granada. Publicaciones Universidad de Granada. Granada. 98 pp + mapa.
- RODRÍGUEZ, J., ZAZO, J., SAÍZ DE OMEÑACA, J.A. (1997). Reforestación de tierras abandonadas con pinos micorrizados artificialmente. *II Congreso Forestal Español. Irati 97*. Libro de Actas. Mesa 3: 555-559.
- SÁEZ, R. (1991) Trufa y truficultura. *Navarra Agraria* (1991) **67**: 5-11.
- SÁEZ, R., DE MIGUEL, A.M., (1995). *La trufa negra. Tuber melanosporum Vitt. Guía práctica de truficultura*. ITGA. Universidad de Navarra. Pamplona. 94pp.
- SAIZ DE OMEÑACA, J.A., RODRÍGUEZ BARREAL, J.A., ZAZO, J. (1992). Micorrización artificial con *Tuber melanosporum* Vitt. de plantas de *Corylus avellana* L. obtenidas asexualmente. *Botánica Pirenaico Cantábrica*. Septiembre 1992: 705-706.
- SIGNORINI, D., (1990). *Il tartufo*. Ed. Ottaviano Mistral. 239 pp.
- SINGER, R., (1964). *Las setas y las trufas. La botánica, el cultivo y la utilización*. Ed. Continental. México. 467 pp.
- SMITH, S.E., READ, D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. San Diego. 605 pp.
- SOUZART, P. (1994). *Guide pratique de Trufficulture*. Ed. Station d'experimentations sur la Truffe. Lycée Professionnel Agricole de Cahors. Le Montat. 96 pp.
- STRULLU, D.G. (1991). *Le mycorhizes des arbres et plantes cultivées*. Technique et Documentation- Lavoisier. Paris. 250 pp.
- TRAPPE, J.M. (1990). Use of truffles and false-truffles around the world. *Atti del 2º Congresso Internazionale sul tartufo. Spoleto, 24-27 novembre 1988*: 19-39.
- VANCINI, G. (1963). *Tartufi e tartuficoltura*. Edagricola. Bologna. 62 pp.
- ZAMBONELLI, A., SALOMONI, S., PISI, A. (1993). Caratterizzazione anatomico morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. *Micologia Italiana* (1993) **3**: 73-90.