



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Efectos de la fertilización en la micorrización con *Tuber melanosporum* y *Tuber aestivum* en la calidad de la planta de *Quercus faginea*

Autor: Alba Cuadrado Sotillos

Tutoras: Mercedes Uscola Fernández y Lara Río Moreno

2021

Índice

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Resumen..... | 1 |
| 2 | Abstract..... | 2 |
| 3 | Introducción | 3 |
| 4 | Materiales y métodos..... | 5 |
| 4.1 | Material vegetal | 6 |
| 4.2 | Cosecha | 7 |
| 4.3 | Análisis químicos..... | 10 |
| 4.4 | Análisis estadísticos..... | 12 |
| 5 | Resultados | 12 |
| 5.1 | Desarrollo/Desempeño de las plantas | 12 |
| 5.1.1 | Biomasa | 12 |
| 5.1.2 | Desarrollo radical..... | 13 |
| 5.1.3 | Concentración de pigmentos fotosintéticos..... | 14 |
| 5.1.4 | Estado nutricional | 14 |
| 5.2 | Nivel de colonización micorrícica..... | 15 |
| 5.3 | Condiciones en el sustrato del cultivo: Conductividad y pH | 16 |
| 6 | Discusión | 17 |
| 6.1 | Efectos de la fertilización en el desarrollo de la planta | 17 |
| 6.2 | Efectos de la fertilización en la micorrización | 17 |
| 6.3 | Aspectos aplicados en la producción de vivero de <i>Q. faginea</i> micorrizada con <i>Tuber</i> spp | 20 |
| 6.4 | Futuras líneas de investigación..... | 21 |
| 6.5 | Conclusiones..... | 21 |
| 7 | Agradecimientos | 22 |
| 8 | Bibliografía | 23 |
| 9 | Material suplementario..... | 27 |

1 Resumen

Debido al abandono de los campos de cultivo, las zonas rurales han perdido su principal motor económico y, además, se ha producido un deterioro de los ecosistemas. Una solución podrían ser las plantaciones truferas, que revitalizarían estas zonas. La fertilización en vivero de plantas micorrizadas favorecería el establecimiento de dichas plantaciones. A pesar de ello, la fertilización no se suele utilizar porque puede inhibir la simbiosis hongo-planta. Se analizó el efecto de la fertilización en plantas de *Quercus faginea* y en la simbiosis con *Tuber aestivum* y *Tuber melanosporum*. Al final del segundo año de cultivo, se midieron la biomasa, el desarrollo radical, la concentración de pigmentos fotosintéticos de las plantas, y el nivel de micorrización, así como las condiciones del sustrato. La fertilización mejoró la calidad de planta, ya que las plantas fertilizadas aumentaron su biomasa y su desarrollo radical, pero también su nivel de micorrización. La fertilización mantuvo el pH y la conductividad en rangos adecuados permitiendo un buen desarrollo de los hongos. *Tuber melanosporum* presentó una mayor abundancia de micorrizas que *T. aestivum*. La calidad de planta también se modificó según la especie de hongo inoculada. En ausencia de fertilización, *T. aestivum* aumentó la concentración de pigmentos fotosintéticos y *T. melanosporum* la biomasa radical. En presencia de fertilización, *T. melanosporum* aumentó la concentración de pigmentos. Por todo ello, se recomienda la fertilización en el cultivo de plantas de *Q. faginea* micorrizadas y la inoculación con cualquiera de las dos especies de *Tuber*.

Palabras clave: calidad de planta, ectomicorriza, morfología, pigmentos fotosintéticos, sustrato.

2 Abstract

Due to the abandonment of agricultural land, rural areas have lost their main economic driver, and there has also been a deterioration of the ecosystems. One possible solution are the truffle plantations that would revitalize these areas. Nursery fertilization of mycorrhized plants would favor the establishment of these plantations. However, fertilization is rarely used, because it can inhibit the fungusplant symbiosis. This study analyzed the effect of the fertilization of *Quercus faginea* seedlings and on the symbiosis with *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum*. Biomass, root development, photosynthetic pigments concentration of the seedlings, and degree of mycorrhization, as well as substrate conditions were measured at the end of the second year of culture. Fertilization improved seedling quality, as fertilized seedlings increased both their biomass and their root development, but also their level of mycorrhization. Fertilization maintained the pH and the conductivity in adequate ranges allowing for a good development of the fungi. *Tuber melanosporum* presented a higher abundance of mycorrhizae than *T. aestivum*. The Tuber species also modified the seedling quality. In the absence of fertilization, *T. aestivum* increased the concentration of photosynthetic pigments and *T. melanosporum* increased root biomass of the seedlings. For fertilized seedlings, *T. melanosporum* increased the concentration of pigments. For all these reasons, the cultivation of *Q. faginea* mycorrhized seedlings should include fertilization and the inoculation with either of the two species of Tuber is recommended.

Key words: ectomicorrhizae, morphology, photosynthetic pigments, plant quality, substrate.

3 Introducción

En los últimos años, las zonas rurales han ido perdiendo su principal motor económico debido al abandono de los campos de cultivo. Entre 1990 y 2012 se han abandonado hasta 900.000 ha de superficie en España (MAGRAMA, 2013). Además del impacto económico, esto conlleva un deterioro de estos ecosistemas, que son dependientes de los cuidados del ser humano. Una de las posibles estrategias para solucionar este problema es convertir los campos abandonados en plantaciones truferas (Domínguez et al., 2002). Por un lado, el interés gastronómico de las trufas permite desarrollar una actividad económica a su alrededor y revitalizar las zonas rurales donde se cultivan (Samils et al., 2008). Por otro lado, se generan ecosistemas agroforestales sostenibles con un alto valor ecológico, ya que estos ecosistemas proporcionan servicios ecosistémicos como el aumento de la biodiversidad y calidad del suelo (Chen et al., 2016).

Los hongos del género *Tuber* forman simbiosis (ectomicorriza) con determinadas especies de plantas originando, bajo condiciones propicias, un cuerpo fructífero, esporocarpio, denominado trufa (Jaillard et al., 2016). Esta unión simbiótica es beneficiosa para ambos. Por una parte, el hongo le proporciona a la planta recursos del suelo (generalmente nitrógeno y/o fósforo y agua), mientras que ésta le aporta carbohidratos al hongo (Nardini et al., 2000).

Dadas las oportunidades que ofrece la trufa, se han creado cultivos en los que se introducen plantas ya inoculadas en el vivero por hongos del género *Tuber* (Jaillard et al., 2016). En España, la especie de hongo del género *Tuber* que más se cultiva es *Tuber melanosporum* (coloquialmente trufa negra). Esta especie requiere unas condiciones climáticas muy estrictas y tiene preferencia por suelos básicos y porosos (Aumeeruddy-Thomas et al., 2016; Chen et al., 2016), lo que provoca que no pueda desarrollarse en todo el ámbito geográfico de la península. Por ello, es interesante estudiar otras especies del género *Tuber* que puedan ocupar aquellos lugares que la trufa negra no puede. Este es el caso de la trufa de verano, *Tuber aestivum*. En los últimos años, se ha incrementado el cultivo de *T. aestivum* debido a su capacidad de desarrollarse en una amplia gama de condiciones climáticas en las que *T. melanosporum* no puede (Jaillard et al.,

2016), además de ser menos exigente en cuanto a sus requerimientos edáficos (Gryndler et al., 2017). A diferencia de la trufa negra, que genera los esporocarpos en invierno, el ciclo de la trufa de verano es más amplio, su principal periodo productivo es en verano cuando las temperaturas son más altas (Zambonelli et al., 2016). Sin embargo, puede darse el caso de que *T. aestivum* produzca esporocarpos en otoño en aquellos lugares donde las condiciones son favorables (temperatura y humedad), ya que su ciclo productivo depende del clima y puede ampliarse (Jaillard et al., 2016). Por lo tanto, es importante estudiar las diferentes combinaciones que pueden formar estos dos hongos con especies de árboles.

En España, la especie de árbol más cultivada para la obtención de trufas es *Quercus ilex* (Reyna y García-Barreda 2008). Sin embargo, hay más especies de árboles que se pueden asociar con *T. melanosporum* y *T. aestivum* para generar trufas, como es el caso de *Quercus faginea* (García-Montero et al., 2007). Es interesante de estudiar esta especie forestal ya que habita de forma exclusiva en la Península Ibérica y puede sobrevivir en ambientes muy variados (Villar-Salvador et al., 2014a). A pesar de que el área en el que se puede desarrollar *Q. faginea* está limitado a zonas con poco estrés hídrico, esta tiene una fotosíntesis más productiva que *Q. ilex*, lo que se traduce en más carbohidratos para la planta y, por consiguiente, para el hongo. De hecho, algunos autores han demostrado que la simbiosis entre *T. melanosporum* - *Q. faginea* es más productiva que la unión entre *T. melanosporum* - *Q. ilex* (GarcíaMontero et al., 2007).

Para ayudar a la planta a superar los primeros años en campo y/o incrementar las probabilidades del establecimiento del hongo, que son los más críticos, se ha fomentado la fertilización de las plantas (Suz, 2009). La fertilización favorece el crecimiento temprano de la plántula, aportándole nutrientes limitantes para su desarrollo y ayudándola a sobrevivir en campo tras la reforestación (Villar-Salvador et al., 2014b). Además, las plantas que han sido fertilizadas tienen un sistema radical más desarrollado que les permite acceder a nutrientes que estén a mayor profundidad y tener mayor capacidad de almacenar reservas (Villar-Salvador et al., 2012; Cortina et al., 2013). También se ha observado que

la fertilización incrementa la capacidad fotosintética de la planta al aumentar la concentración de clorofilas (maquinaria fotosintética) y, por tanto, la disponibilidad de carbohidratos (Warren et al., 2000). Todos estos atributos mejorados en plantas fertilizadas deberían favorecer la micorrización. Sin embargo, algunos autores defienden que la fertilización inhibe la formación de ectomicorrizas por lo que generalmente las plantas micorrizadas no se fertilizan (García-Barreda et al., 2017).

Por todo ello, hay diversas líneas de investigación que apoyan la idea de que una dosis adecuada de fertilizante permite mejorar la calidad de la planta y su crecimiento sin perjudicar al hongo (García-Barreda et al., 2017). Por lo cual, es interesante estudiar la relación entre la fertilización y la colonización micorrízica en plantas inoculadas por distintos hongos del género *Tuber* (García-Barreda et al., 2017). Además, si bien existen referencias disponibles sobre *T. melanosporum* en su respuesta a la fertilización (García-Barreda et al., 2017) apenas hay referencias sobre *T. aestivum*.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es analizar cómo afecta el uso del fertilizante a la simbiosis entre *Q. faginea* y dos hongos del género *Tuber*: *T. melanosporum* y *T. aestivum*. La hipótesis es que la fertilización favorece el desarrollo de la planta y, por consiguiente, el del hongo al aportar nutrientes esenciales para el crecimiento de ambos. También se espera que *T. aestivum* presente mejores resultados respecto a la fertilización, al ser menos exigente que *T. melanosporum* en cuanto a sus requerimientos ecológicos.

4 Materiales y métodos

Se llevó a cabo un experimento factorial completo con plantas de *Q. faginea* con dos tratamientos de fertilizante: fertilizadas y sin fertilizar; y con tres tipos de inoculación: no inoculadas, inoculadas con *T. melanosporum* e inoculadas con *T. aestivum*. Este Trabajo Fin de Grado evalúa la respuesta al final del segundo año de crecimiento de las plantas.

4.1 Material vegetal

Se utilizaron un total de 144 plantas de *Q. faginea* de dos años. Las plantas fueron sembradas en 2019, a partir de semillas de la Alcarria obtenidas en “El Serranillo” (Centro de Recursos Genéticos Forestales). Las plantas fueron cultivadas en 12 bandejas forestales, con 35 alveolos de 350 cm³ cada uno. El sustrato de cultivo fue una mezcla de turba rubia (Kekkilä Professional, Finlandia) y piedra caliza (97,5% CaCO₃, Tricalsa, España), para aumentar la basicidad del suelo y así favorecer el desarrollo de *Tuber* spp. (Chen et al., 2016).

Un tercio de las plantas perteneció a cada tratamiento de inoculación (cuatro bandejas por tratamiento de inoculación): sin inocular, inoculadas con *T. melanosporum* o inoculadas con *T. aestivum*. La inoculación se realizó en junio de 2019, mediante la inyección de 10 ml de una disolución 1:10 p_{trufa}:V_{agua desionizada} o 1,4:10 p_{trufa}:V_{agua desionizada} de esporocarpos de *T. melanosporum* y *T. aestivum*, respectivamente.

Durante el primer año, la mitad de las plantas de cada tratamiento de inoculación (dos bandejas) se fertilizaron con un fertilizante N:P:K (1:0,5:1) donde el N se aplicó en una mezcla equimolar de nitrato, amonio y aminoácidos. La fertilización se aplicó durante 32 semanas, hasta aportar un total de 202 mg de N planta⁻¹. El resto de las plantas no recibió ningún tipo de fertilización. Durante el segundo año de cultivo las plantas no fueron fertilizadas, por lo que crecieron a partir de las reservas creadas durante el primer año. Durante este segundo año, las plantas se regaron a saturación con regularidad, para evitar estrés hídrico.

Las plantas se mantuvieron, durante todo el cultivo, en un túnel de cultivo del Real Jardín Botánico Juan Carlos I de la Universidad de Alcalá, bajo una malla de sombreado con una reducción de luz del 30%. Las condiciones de temperatura y radiación se monitorizaron cada hora, durante todo el experimento, mediante dos sensores grabadores de datos (Pendant Temp/luminosidad, Onset, EEUU) (Figura S1 en material suplementario).

4.2 Cosecha

A finales de octubre de 2020, se realizó la cosecha de las plantas para analizar el efecto del fertilizante en la calidad de las plantas y en su nivel de colonización por los distintos hongos. Se cosecharon al azar 12 plantas por tratamiento (6 plantas por bandeja).

En primer lugar, 2 hojas maduras del tercio superior de cada planta se congelaron hasta realizar los análisis químicos. Posteriormente, las raíces de las plantas se limpiaron con agua para eliminar la turba y analizar el desarrollo del sistema radical. El nivel de desarrollo radical se clasificó según una escala de elaboración propia con las siguientes categorías: 0, cuando había pocas raíces secundarias y ninguna terciaria; 1, cuando solo aparecían algunas raíces terciarias; 2, raíces terciarias frecuentes pero desigualmente distribuidas; 3, cuando se encontraban abundantes raíces terciarias pero sin formar glomérulos; 4, numerosas puntas terciarias formando glomérulos y glomérulos abundantes pero no distribuidos homogéneamente; y finalmente, 5 se le otorgaba a aquellas plantas que poseían un sistema radical bien desarrollado, con glomérulos abundantes homogéneamente distribuidos (Figura 1).

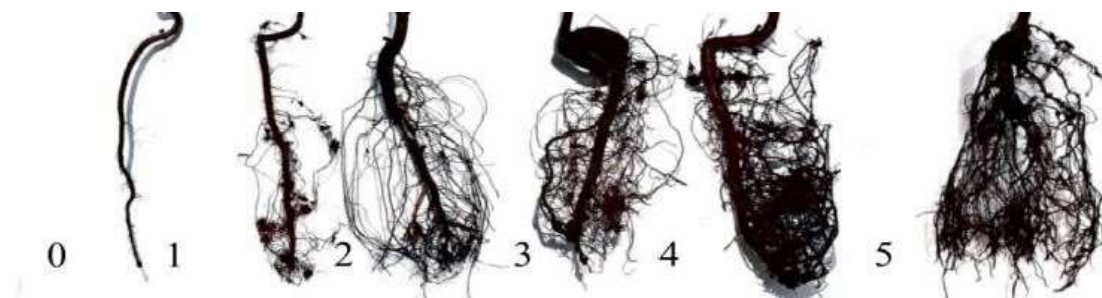


Figura 1. Escala de niveles de desarrollo radical, donde 0 indica el menor desarrollo radical y 5 el mayor desarrollo.

Tras la determinación del nivel de desarrollo radical, los sistemas radicales se observaron con una lupa a 10X para identificar las puntas micorrizadas. Para la identificación visual de la especie hongo, se siguieron los criterios de Agerer (1987-2012), que establece las características morfológicas de cada especie de hongo. Las puntas micorrizadas presentan cierto engrosamiento, además de

presentar diferente coloración que las puntas sin micorrizar. Tras confirmar la presencia de puntas micorrizadas, se identificó la especie de hongo según su morfotipo (textura, color y forma de la punta micorrizada). Para ello, se observaron varias puntas micorrizadas de cada planta al microscopio a 40X. A la lupa, el género *Tuber* se identifica porque las puntas micorrizadas tienen forma de dedo de guante, textura arenosa, y color amarillo-pardo (Figura 2a) y, además, se agrupan en forma de árbol (Figura 2e). *Tuber melanosporum* se caracteriza por poseer pocas hifas, cortas y ramificadas en ángulo de 90°, y formar una estructura de puzle en el manto (Figura 2 b-d). Sin embargo, *Tuber aestivum* se caracteriza por tener gran cantidad de hifas alargadas y un dibujo poligonal en el manto (Figura 2 f-h).

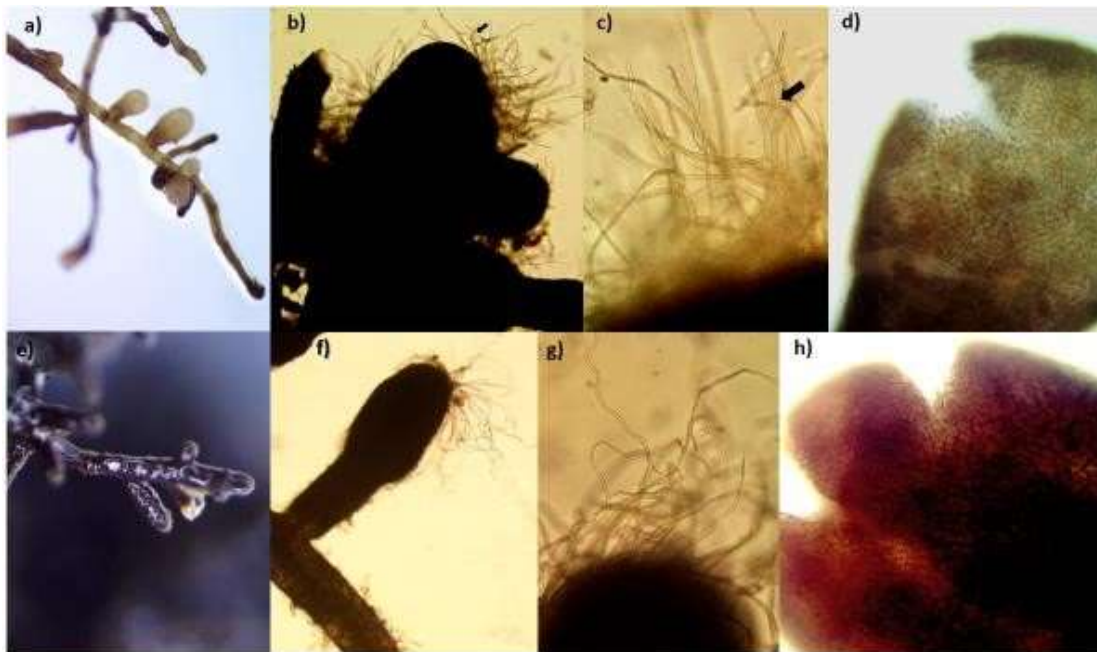


Figura 2. Caracteres morfológicos de *Tuber melanosporum* (a-d) y *Tuber aestivum* (e-h) identificados en las plantas de *Q. faginea*. Morfología de puntas en lupa: con forma en dedo de guante amarillo-marronaceas y textura arenosa (a) y configuración en árbol de puntas múltiples (e); morfología de hifas en microscopio a 4x: (b) cortas bifurcadas en ángulo de 90° o (f) largas sin ramificación; (c, g) detalle de hifas en microscopio 10x; y detalle del manto en microscopio a 40x (manto en puzle (d), y manto geométrico (h)).

Una vez detectadas las especies de *Tuber* de interés y confirmada su especie, se estableció el nivel de micorrización de cada planta, según la escala Chevalier y Grente (Andrés-Alpuente et al., 2014). Este método establece una escala de 0 a 5 según el nivel de micorrización, basado en la abundancia y disposición de las puntas micorrizadas dentro del cepellón (Tabla 1). En caso de detectar puntas micorrizadas por hongos distintos a *Tuber* spp. se consideró como presencia de hongos no deseados o contaminación.

Tabla 1. Nivel de micorrización según la escala Chevalier y Grente (Andrés-Alpuente et al., 2014)

| Nivel de micorrización | Características |
|-------------------------------|--|
| 0 | Plantas que no tienen ninguna punta micorrizada |
| 1 | Plantas que poseen algunas puntas micorrizadas que son difíciles de encontrar |
| 2 | Solo se encuentran puntas micorrizadas en una parte de las raíces |
| 2,5 | Aparecen puntas micorrizadas repartidas por toda el área de las raíces con una densidad un poco más alta en la parte superior que en la inferior del sistema radicular |
| 3 | Todo el sistema radicular tiene una densidad bastante alta de puntas micorrizadas, habiendo más en una parte que en otra |
| 4 | Aparecen glomérulos densos micorrizados por toda la superficie radicular |
| 5 | Numerosos glomérulos muy densos por toda la parte radicular |

Una vez medidos estos parámetros, se secaron las plantas en estufa a 60°C hasta que estabilizaron el peso. Posteriormente, se determinó el peso seco de la parte aérea (hojas y tallo) y la parte radical de cada planta (Figura 3 a-b).

Además, se comprobó si el fertilizante modifica las condiciones del sustrato, ya que esto influye en desarrollo de los hongos. Para ello, se homogenizó el sustrato de cada planta y se preparó una mezcla 1:5 ($V_{\text{suelo}} : V_{\text{agua desionizada}}$) del suelo en suspensión (Ansorena, 1994). Esta mezcla se mantuvo en agitación fuerte durante 1 hora (Figura 3c). Después, se midieron, en el extracto

acuoso de la suspensión, la conductividad con un conductímetro (CM35+, Crison, España) (Figura 3d) y el ph con pHímetro (micropH2001, Crison, España).



Figura 3. Mediciones realizadas durante la cosecha. Plantas divididas en los distintos tejidos: hojas, tallos, raíz gruesa y raíces finas (a), y peso de los tejidos (b). Muestras de suelos en suspensión y agitación (c) y medición de conductividad (d).

4.3 Análisis químicos

En primer lugar, se cuantificó la concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas congeladas de la cosecha de octubre de 2020, siguiendo el método de Barnes, 1992. De las hojas congeladas de cada planta, se tomaron 2 discos con un sacabocados (4 mm de diámetro), aleatoriamente evitando el nervio central. Se pesó el tejido en una balanza de precisión, y se le añadieron 3 ml DMSO. A continuación, se mantuvieron las muestras en estufa durante cuatro horas a 60°C para extraer los pigmentos. Una vez extraídos los pigmentos, se midió la absorbancia de la fase líquida de cada muestra, con la ayuda de un espectrofotómetro (UV1800, Shimadzu, Japón), a seis longitudes de onda (665.1, 649.1, 480, 750, 435 y 415 nm). A partir de la absorbancia se calculó la concentración de cada pigmento fotosintético (clorofilas a y b, y carotenos y xantofilas) utilizando las ecuaciones de Wellburn, 1994. La concentración de pigmentos totales se calculó como la suma de la concentración de clorofilas a y b, carotenos y xantofilas.

Además, se analizó el estado nutricional de las partes aéreas y radicales de las plantas cosechadas en octubre de 2020, mediante el método de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) (Figura 4). Esta técnica cuantifica la energía que absorbe cada muestra en un amplio conjunto de

longitudes de onda, según los diferentes tipos de enlaces moleculares que posea. Para ello, se molieron los tejidos secos con un molino de bolas (PM100, Retsch Haan, Alemania), hasta que se molió y homogeneizó la muestra por completo. Las muestras molidas se introdujeron en cápsulas de 6x10 cm por fuera, 5x6,5 cm por dentro y 1 cm de profundidad, formando una capa superior a 2 mm de grosor (Figura 4a). Las cápsulas se introdujeron en el equipo NIRS (NIRS system 5000, Foss, Dinamarca; Figura 4b) y se midió su absorbancia cada dos nanómetros en el rango de longitudes de onda de 1100 a 2498 nm. Este proceso se realizó dos veces para cada muestra. El conjunto de absorbancias a cada longitud de onda compone el espectro de cada muestra (figura 4c). Una vez obtenidos los espectros de todas las muestras, se utilizó el software winisi v.1.4 (Infrasoft Internacional, Estados Unidos) para predecir la concentración de NPK de cada muestra. En primer lugar, se comprobó la presencia de outliers espectrales. Tras esto, se realizaron las predicciones utilizando un modelo generado para varias especies del género *Quercus* (Chanove, 2018). Dicho modelo utiliza la transformación matemática 2, 10, 10, 1. El primer dígito corresponde al orden de la derivada, el segundo indica el tamaño del segmento de la derivación, el tercero hace referencia al tamaño de los segmentos de suavización y el cuarto, hace referencia al segundo suavizado. Las muestras que no se pudieron analizar por el método NIRS, debido a no disponer de suficiente volumen de muestra, más un 10% de muestras analizadas por el método NIRS (para la validación de las estimaciones) se enviaron al laboratorio NutriLab (Universidad Rey Juan Carlos, Madrid) para su análisis de nutrientes NPK, por vía húmeda.



Figura 4. Cápsulas de medición en el NIRS (a), equipo de NIRS (b) y espectro de absorbancia a todas las longitudes de ondas para una muestra (c).

4.4 Análisis estadísticos

Se analizó el efecto del fertilizante y la inoculación en el peso seco de los órganos (parte aérea, parte radical y planta), la concentración de los pigmentos fotosintéticos y el pH y la conductividad del sustrato. Para ello, en primer lugar, se realizó una comprobación de la normalidad de los datos con el test de Shapiro ($\alpha=0,05$). También se comprobó la homocedasticidad y colinealidad de los datos. El efecto del fertilizante y la inoculación en cada una de las variables se analizó con un modelo lineal. Cuando los datos no fueron normales, se ajustó un modelo lineal generalizado de distribución gamma. Para comprobar qué variables eran significativas, se realizó un ANOVA. Cuando se detectaron efectos significativos de la fertilización y/o la inoculación se realizó un test posthoc de Tukey ($\alpha=0,05$) para determinar las diferencias entre tratamientos.

Para analizar la fertilización y la inoculación en la micorrización y el desarrollo radical, se realizó un modelo logístico, considerando que la variable dependiente tiene una respuesta nominal y, por tanto, sigue una distribución multinomial. Todos los análisis estadísticos se hicieron con RStudio 3.6.1 (Rstudio Team, 2020).

5 Resultados

5.1 Desarrollo/Desempeño de las plantas

5.1.1 Biomasa

La aplicación de fertilizante incrementó la masa de la parte aérea con respecto a las plantas no fertilizadas ($X^2_1=26,69$; $p<0,001$; Figura 5). Sin embargo, la masa de la parte aérea no fue afectada ni por el tipo de inóculo ($X^2_2=83,33$; $p=0,98$), ni por la interacción de fertilizante con inóculo ($X^2_2=25,77$; $p=0,40$). En cambio, tanto la masa de la parte radical como la masa total de la planta sí que dependieron de la combinación de fertilizante e inóculo (interacción fertilizante \times inóculo $X^2_2=26,71$; $p<0,001$). En las plantas fertilizadas, el inóculo no generó diferencias de biomasa. En cambio, en las plantas no fertilizadas, la inoculación con *T. melanosporum* maximizó la masa radical, la inoculación con *T. aestivum* la minimizó y las no inoculadas presentaron una masa radical intermedia, al igual que ocurrió en planta completa.

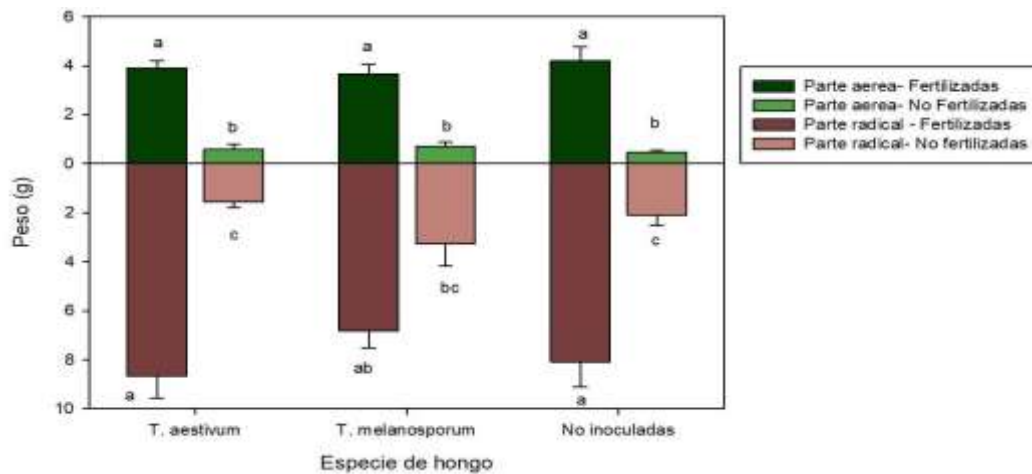


Figura 5. Peso de los distintos órganos de plantas de dos años de edad de *Q. faginea* inoculadas con especies de hongos del género *Tuber* y con dos tratamientos de fertilización durante el primer año de cultivo: no fertilizadas y fertilizadas. Los datos son medias \pm error estándar. Distintas letras en el mismo órgano indican diferencias significativas según Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.1.2 Desarrollo radical

Solo la fertilización presentó un efecto significativo en el nivel de desarrollo radical ($X^2_5 = 50,039$; p -valor $<0,001$), teniendo un mayor desarrollo radical aquellas plantas que estaban fertilizadas. La inoculación no afectó al desarrollo radical ($X^2_{10} = 12,40$; p -valor $=0,26$) y tampoco la combinación de fertilizante e inóculo ($X^2_{10} = 7,68$; p -valor $=0,66$; Figura 6).

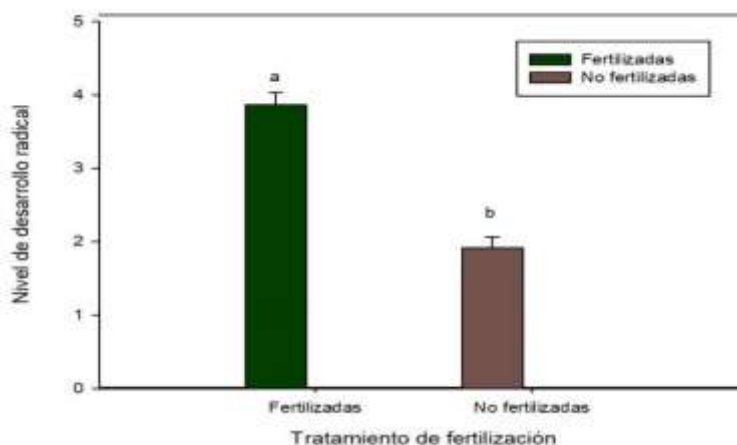


Figura 6. Nivel de desarrollo radical de plantas de *Q. faginea* de dos años cultivadas el primer año con dos tratamientos de fertilización: fertilizadas y no fertilizadas. Los datos son medias \pm error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas en función del fertilizante según Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.1.3 Concentración de pigmentos fotosintéticos

Por otro lado, el efecto del fertilizante en la concentración de los pigmentos fotosintéticos de las plantas dependió de la inoculación aplicada (interacción fertilizante \times inóculo $X^2_2 = 5,91$; $p < 0,001$; Figura 7). Cuando las plantas fueron fertilizadas no hubo diferencias significativas asociadas a la inoculación en la concentración de pigmentos fotosintéticos de las plantas. En cambio, en ausencia de fertilización hubo diferencias significativas entre los dos inóculos, teniendo las plantas inoculadas con *T. melanosporum* menor concentración de pigmentos que las inoculadas con *T. aestivum* y las plantas no inoculadas tuvieron una concentración de pigmentos fotosintéticos intermedia.

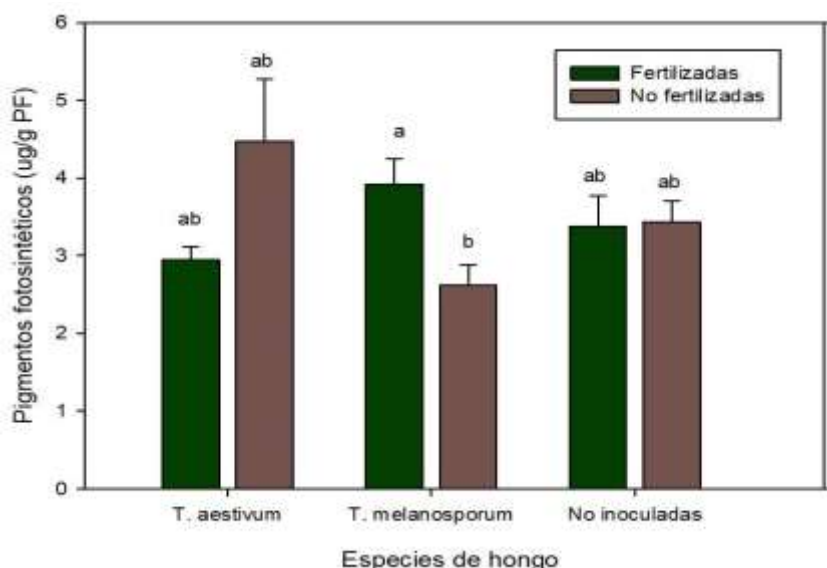


Figura 7. Concentración de pigmentos fotosintéticos de plantas de dos años de *Q. faginea* a las que se aplicó distinto inóculo: no inoculadas, o inoculadas con *T. aestivum*, o con *T. melanosporum*; y, durante el primer año, cultivadas con distinto fertilizante: fertilizadas y no fertilizadas. Los datos son medias \pm error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0,05$).

5.1.4 Estado nutricional

En este Trabajo Fin de Grado se realizaron análisis para comprobar el estado nutricional de las plantas. Sin embargo, debido al tiempo del análisis y la cantidad de muestras, no llegaron a recibirse a tiempo los resultados de concentración de

nutrientes por vía húmeda, necesarios para la validación de los modelos NIRS. También hay que mencionar que aquellas plantas que no habían sido fertilizadas eran más pequeñas que las fertilizadas y muy pocos individuos pudieron analizarse por NIRS, habiendo muy pocas estimaciones de estas plantas para poder realizar análisis estadísticos con las predicciones no validadas.

5.3 Nivel de colonización micorrícica

Sólo se detectaron hongos micorrícicos contaminantes en las plantas no inoculadas, que no presentaron micorrizas del género *Tuber*. Al analizarse el nivel de inoculación en las plantas inoculadas, se observó que el efecto de la especie inoculada fue constante en ambos tratamientos de fertilizante (sin interacción inóculo x fertilizante, $X^2_4 = 2,97$; p-valor=0,56). Sin embargo, se detectaron diferencias marginalmente significativas entre los inóculos ($X^2_4 = 9,34$; p-valor=0,053) encontrándose que *T. melanosporum* presentaba más puntas micorrizadas y, por tanto, mayor nivel de micorrización que *T. aestivum*. Además, se encontró un efecto altamente significativo del fertilizante ($X^2_4 = 15,30$; p-valor<0,001), aquellas plantas que habían sido fertilizadas presentaban una mayor abundancia de colonización micorrícica, un mayor nivel de micorrización, que aquellas que no habían sido fertilizadas (Figura 8).

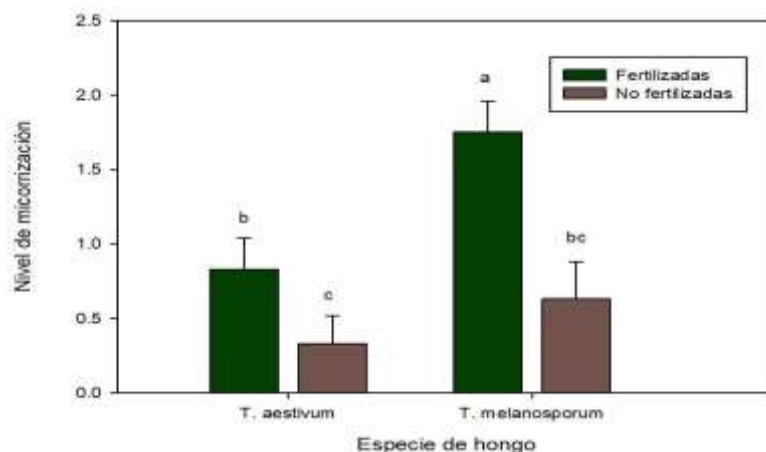


Figura 8. Nivel de micorrización, según la escala de Chevalier y Grente (Andrés- Alpuente, 2014), de plantas de dos años de *Q. faginea* inoculadas con *T. aestivum*, o con *T. melanosporum* y, durante el primer año, fertilizadas o no fertilizadas. Los datos son medias \pm error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha=0,05$).

5.5 Condiciones en el sustrato del cultivo: Conductividad y pH

En cuanto al pH, se observó que no había diferencias asociadas al inóculo ($X^2_2 = 0,14$; $p=0,43$), ni al fertilizante ($X^2_1 = 0,14$; $p=0,25$). Sin embargo, sí que se obtuvieron diferencias significativas en la combinación de inóculo y fertilizante, teniendo un pH más alto el sustrato de las plantas que estaban fertilizadas e inoculadas por cualquiera de los hongos del género *Tuber*, que el sustrato de las que no estaban ni inoculadas, ni fertilizadas (interacción inóculo x fertilizante $X^2_2 = 0,12$; $p=0,037$).

Con respecto a la conductividad, aunque no se encontraron unas diferencias significativas asociadas ni al fertilizante ($X^2_1 = 2,63$; $p = 0,82$) ni al inóculo ($X^2_2 = 2,63$; $p=0,20$), sí que se encontró que las plantas que habían sido inoculadas por *T. melanosporum* y habían sido fertilizadas, presentaban una mayor conductividad en el sustrato que las que no estaban fertilizadas (interacción inóculo x fertilizante $X^2_2 = 2,42$; $p < 0,001$). En cuanto a *T. aestivum*, no se encontraron diferencias de conductividad en el sustrato entre aquellas plantas que habían sido fertilizadas y las que no.

Tabla 2. pH y conductividad en soluciones 1:5 (Vsustrato:Vagua) de los sustratos de cultivo de plantas cultivadas con distintos inóculos y dos tratamientos de fertilización: no fertilizadas y fertilizadas. Los datos son medias \pm error estándar. Distintas letras en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre tratamientos según Tukey ($\alpha = 0,05$).

| Tratamiento | pH | Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-2}$) |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| Fertilizadas | | |
| None | 7,21 \pm 0,13b | 76,35 \pm 2,73ab |
| <i>T. aestivum</i> | 7,54 \pm 0,09a | 71,28 \pm 5,86b |
| <i>T. melanosporum</i> | 7,49 \pm 0,09a | 84,09 \pm 5,05a |
| No fertilizadas | | |
| None | 7,41 \pm 0,09a | 85,12 \pm 3,66a |
| <i>T. aestivum</i> | 7,34 \pm 0,09ab | 76,11 \pm 2,67b |
| <i>T. melanosporum</i> | 7,23 \pm 0,07b | 73,16 \pm 3,14b |
| Anova | | |
| Inóculo | $X^2_{68} = 0,14$; p-valor = 0,430 | $X^2_{68} = 2,63$; p-valor = 0,196 |
| Fertilizante | $X^2_{67} = 0,14$; p-valor = 0,245 | $X^2_{67} = 2,63$; p-valor = 0,819 |
| Inóculo x fertilizante | $X^2_{65} = 0,12$; p-valor = 0,037 | $X^2_{65} = 2,42$; p-valor = 0,044 |

6 Discusión

6.1 Efectos de la fertilización en el desarrollo de la planta

En nuestro experimento, la fertilización favoreció el desarrollo de la planta, confirmando la primera hipótesis planteada. Se encontró que aquellas plantas que habían sido fertilizadas presentaban una biomasa mayor que las no fertilizadas. Esto se debe a que, al incorporar los nutrientes esenciales en unas cantidades adecuadas, las plantas se desarrollan favorablemente (VillarSalvador et al., 2012; Villar- Salvador et al., 2014b). En cambio, las plantas no fertilizadas sufrieron un desarrollo más escaso, posiblemente a causa de la falta de nutrientes esenciales (NPK) ya que la turba, el sustrato en el que se desarrollaron, es un sustrato muy inerte que no aporta nutrientes (Ansorena; 1994). Además, las plantas se fertilizaron solamente durante el primer año, por lo que durante el segundo año se nutrieron de las reservas que habían almacenado para desarrollarse. Por lo tanto, el menor desarrollo de las plantas no fertilizadas puede deberse también a una carencia de reservas (Uscola et al., 2015; Villar- Salvador et al., 2014b). Estos resultados reafirman el modelo conceptual planteado por Villar-Salvador et al. (2012), que plantea que la fertilización favorece el crecimiento temprano de la plántula al aportarle nutrientes limitantes para su desarrollo. Igualmente, se observó que las plantas fertilizadas presentaban un mayor nivel de desarrollo radical. Esto les permite un mayor acceso a los nutrientes que se encuentran a mayor profundidad edáfica o más alejados de la planta (Villar-Salvador et al., 2012; Cortina et al., 2013).

6.2 Efectos de la fertilización en la micorrización

En el presente estudio, la fertilización no inhibió la micorrización si no que la aumentó. Sin embargo, otros autores han encontrado efectos negativos de la fertilización en la micorrización (Díaz et al., 2009; Idol and Diarra 2016). En este experimento, la fertilización aumentó la presencia de puntas micorrizadas con ambos hongos estudiados (*T. aestivum* y *T. melanosporum*). La micorrización

solo tiene lugar en puntas terciarias, por lo tanto, una mayor abundancia de puntas terciarias aumenta el tejido colonizable por las micorrizas, favoreciendo su desarrollo. Mientras que las plantas no fertilizadas apenas alcanzaron el nivel 2 de desarrollo radical, las fertilizadas alcanzaron el nivel 4. Así, las plantas que fueron fertilizadas, presentaron un mayor sistema radical y, por tanto, un mayor número de puntas terciarias y, consecuentemente, un mayor nivel de micorrización.

La presencia de efectos negativos en la micorrización generalmente se asocia a que la fertilización puede alterar las condiciones del suelo, haciéndolas poco adecuadas para los hongos e inhibiendo el proceso de simbiosis hongoplanta (Landis., 1989). Sin embargo, en nuestro estudio, la fertilización mantuvo el pH y la conductividad en rangos adecuados para el desarrollo de las dos especies de hongo estudiadas. El pH del sustrato sobre el que se desarrollaron las plantas fertilizadas e inoculadas con *T. melanosporum* fue de 7,50, que está dentro del rango de adecuación de esta especie (7,5 a 8,3) (Jaillard et al., 2016). Igualmente *T. aestivum* se desarrolló en un sustrato con un pH de 7.54, también dentro de su rango (5,9 a 8,4) (Molinier et al., 2016). En cambio, en las plantas no fertilizadas, sí que se observó que *T. melanosporum* tenía un pH por debajo del rango de adecuación (7,23; la turba tiene un pH ácido, menor de 5), lo que podría haber influido negativamente en el desarrollo del hongo. Por el contrario, *T. aestivum* en plantas no fertilizadas se desarrolló dentro del rango de adecuación de pH (7,34).

Respecto a la conductividad, no hay un rango óptimo establecido para cada hongo, pero sí que hay autores que indican que un aumento de la salinidad puede llegar a perjudicar la presencia de puntas micorrizadas, al menos en el género *Tuber* (Nadim et al., 2016). En el estudio realizado los valores de conductividad fueron muy bajos en todos los tratamientos. A pesar de que se encontraron ciertas diferencias, al ser valores tan bajos no se podrían atribuir las diferencias de micorrización a la conductividad/salinidad del sustrato. Los bajos valores de conductividad pueden deberse a que las plantas solo se fertilizaron el primer año. Los posibles nutrientes remanentes en el sustrato durante el segundo año debieron ser, o absorbidos por las plantas o lavados por los riegos, de forma

que no se detectó un incremento de la conductividad en el sustrato al final del segundo año en las plantas fertilizadas.

La respuesta al fertilizante difirió entre los hongos del género *Tuber*. En concreto, y contrariamente a la hipótesis, *T. melanosporum* presentó un mayor nivel de micorrización en presencia de fertilizante que *T. aestivum*. Se esperaba que la trufa de verano presentara mayor nivel de micorrización al ser una especie menos exigente y con mayor amplitud climática y, especialmente, edáfica, lo que debería volverla más tolerante a los posibles efectos negativos de la fertilización (Gryndler et al., 2017; Molinier et al., 2016). Una posible explicación podría ser que el nivel de micorrización de las dos especies de hongo se evaluó en invierno, coincidiendo con la época del año de producción de esporocarpos, y por tanto, de mayor actividad de *T. melanosporum* (Jaillard et al., 2016). Esto hace que se pueda ver una mayor abundancia de puntas micorrizadas en esta especie que en otros momentos del año. Sin embargo, la época más productiva para *T. aestivum*, y donde se visualizarían mayor abundancia de puntas micorrizadas, sería en verano, cuando las temperaturas son más altas (Molinier et al., 2016), siendo invierno una época poco adecuada para visualizarlas. Otra posible explicación podría ser que la especie de árbol elegida (*Q. faginea*) favoreciera más a *T. melanosporum* que a *T. aestivum*. De hecho, García-Montero et al. (2007) demostraron que la simbiosis entre *T. melanosporum* y *Q. faginea* es más productiva que la unión entre *T. melanosporum* y otras especies de árboles, lo que indica una alta afinidad entre *Q. faginea* y *T. melanosporum*.

Desde el punto de vista opuesto, la micorrización puede aumentar la calidad de la planta ya que el hongo puede acceder a más nutrientes dándoselos a la planta y favoreciendo su supervivencia (Nardini et al., 2000). Los resultados demuestran que, en ausencia de fertilización, ambos hongos favorecieron la calidad de planta. En primer lugar, *T. melanosporum* incrementó la biomasa permitiendo explorar más profundamente el suelo para obtener nutrientes. En segundo lugar, *T. aestivum* en ausencia de fertilización, incrementó la concentración de pigmentos, reforzando la maquinaria fotosintética. Esto puede traducirse en mejor capacidad fotosintética y, por lo tanto, mayor capacidad de producción de carbohidratos (Warren et al., 2000). Sin embargo, esta

optimización de la maquinaria fotosintética no se tradujo en un mayor crecimiento de la planta. Los hongos simbiotes demandan muchos carbohidratos durante la fase de colonización micorrícica (Nylund y Wallander, 1989), lo que explicaría este resultado contradictorio. También se observó una mayor concentración de pigmentos en las plantas que habían sido inoculadas con *T. melanosporum* y habían sido fertilizadas que en las no fertilizadas. El aumento de la concentración de pigmentos en este caso puede deberse al mayor desarrollo radical, que facilita el acceso a mayor cantidad de nutrientes, mejorando la maquinaria fotosintética. A pesar de tener mayor capacidad fotosintética, esto no se tradujo en mayor crecimiento respecto a las plantas inoculadas con *T. aestivum*. Esto puede deberse a una priorización hacia el simbiote al distribuir los nutrientes, lo que también explicaría que se maximice el nivel de micorrización de *T. melanosporum*. Sin embargo, a largo plazo, una capacidad fotosintética mejorada en plantas, tanto inoculadas con *T. aestivum* y sin fertilizar, como con *T. melanosporum* y fertilizadas, podría favorecer su crecimiento en campo.

6.3 Aspectos aplicados en la producción de vivero de *Q. faginea* micorrizada con *Tuber* spp.

Dados los resultados obtenidos en el experimento, se recomienda fertilizar las plantas de *Q. faginea* e inocular con ambos tipos de hongos durante su cultivo en vivero. Aunque hay una gran variedad de especies de árboles con las que pueden formar simbiosis los hongos del género *Tuber*, *Q. faginea* ha demostrado desarrollarse bien con ambas especies de hongos. Sin embargo, dados los altos niveles de micorrización de *T. melanosporum* con *Q. faginea*, y para la obtención trufa de una mayor rentabilidad, se recomienda priorizar la inoculación con *T. melanosporum* ya que, aunque es más exigente en sus requerimientos ecológicos que *T. aestivum*, la trufa que produce tiene un mayor valor económico. En cambio, en sitios con condiciones edáficas no adecuadas para *T. melanosporum*, mayor xericidad, y/o alto estrés por frío en invierno, y a pesar de su menor nivel de micorrización, se recomienda el uso de *T. aestivum*, ya que es

una especie menos exigente en cuanto a sus requerimientos edáficos y ecológicos.

En cualquier caso, independientemente de qué hongo se inocule, se recomienda el uso de fertilización, ya que aumentó notablemente la calidad de planta. Por un lado, la fertilización aumentó el desarrollo de la planta y, por otro lado, también favoreció la micorrización.

6.4 Futuras líneas de investigación

El estudio realizado pertenece a un proyecto mayor llamado TubeRest. Este proyecto analiza el efecto de distintas fuentes de N aplicadas en el fertilizante en el desarrollo de la planta y en la micorrización con ambas especies de *Tuber*. Además de estudiar *Q. faginea*, también se estudia otra especie: *Q. ilex*. Además de las variables analizadas en este proyecto, se estudiará el efecto en el estado nutricional mediante evaluación de las concentraciones de nutrientes (N, P y K y carbohidratos). También se realizarán análisis químicos de prolina que es un indicador del estrés al que están sometidas las plantas.

Futuras investigaciones deberían abarcar más especies de árboles que no sean del género *Quercus spp*, para comprobar si estas dos especies de hongo del género *Tuber* responden igual a la fertilización cuando se asocian con otros simbiontes. También sería interesante estudiar la respuesta de estas dos especies de hongo en diferentes climas para definir recomendaciones de uso en cultivo según las condiciones concretas del sitio, ya sea para revitalizar la economía de ese lugar o para ayudar a revegetar una zona que haya sido abandonada.

6.5 Conclusiones

La fertilización mejoró la calidad de la planta, ya que aumentó su biomasa y su desarrollo radical y, además, favoreció la micorrización de ambas especies de *Tuber*. Además, la fertilización no cambió las condiciones del sustrato y se

mantuvieron las condiciones adecuadas para el desarrollo de la planta y la simbiosis entre hongo-planta. Las plantas fertilizadas e inoculadas con *T. melanosporum* presentaron una mayor concentración de pigmentos que las que no estaban fertilizadas. En cambio, las plantas inoculadas con *T. aestivum* presentaron una mayor concentración de pigmentos en ausencia de fertilización y mayor biomasa que las plantas sin fertilizar e inoculadas con *T. melanosporum*. Además, se encontró un mayor nivel de micorrización en las plantas inoculadas con *T. melanosporum* respecto a las inoculadas con *T. aestivum* independientemente de si estaban fertilizadas o no. Para finalizar, se recomienda la inoculación con *T. melanosporum* cuando se busque una trufa de mayor valor económico, mientras que se recomienda *T. aestivum* cuando las condiciones del terreno sean poco propicias y se necesite un hongo con menores requerimientos.

7 Agradecimientos

Me gustaría empezar agradeciendo, al Real Jardín Botánico Juan Carlos I y al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá por dejarnos utilizar las instalaciones para realizar los análisis del proyecto. Igualmente agradecer al proyecto TuberRest (CM/JIN/2019-002) por financiar el experimento. También me gustaría agradecerlo al Departamento de Producción Agraria de la UPM por haberme permitido usar sus instalaciones e infraestructuras para llevar a cabo una parte de mi experimento (NIRS).

También me gustaría darles las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado día tras día a realizar el experimento: Sofía Aguirre, Eva Monedero y Ana Belén Garrido. También me gustaría agradecer a Juan Oliet y a Paloma García por ayudarme con el manejo del NIRS. Finalmente, me gustaría agradecerlo a mis dos mentoras a quienes admiro y me han ido apoyando e inspirando en cada paso que he dado. Me han enseñado mucho acerca del proyecto y de otros que tenían a su cargo. Ha sido un placer trabajar con ellas y me llevo un recuerdo muy grato. Muchas gracias por todo, Mercedes Uscola y Lara Río.

8 Bibliografía

- Agerer, R. 1987–2012. Colour atlas of ectomycorrhizae. 1st–15th delivery, Einhorn, Schwäbisch Gmünd
- Andrés-Alpuente, A., Sánchez, S., Martín, M., Aguirre, Á.J., Barriuso, J.J. 2014. Comparative analysis of different methods for evaluating quality of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza* 24: 29-37
- Ansorena, J. 1994. Fundamentos de nutrición. En: Sustratos: propiedades y características. Mundi- Empresa, Madrid, pp 73-103
- Aumeeruddy-Thomas, Y., Taschen, E., Richard, F. 2016. Taming the Black Truffle (*Tuber melanosporum*). Safeguarding Mediterranean food and ecological webs. En: Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds.), The Mediterranean region under climate change. A scientific update RD Éditions, Marseille, pp. 533-542.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S and Davison AW. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 32: 85-100
- Chanove Manrique, Andrea Marieta. 2018. Modelo de predicción del estado nutricional de las especies *Q. ilex*, *Q. pubescens* y *Q. robur* por el método de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). Máster Universitario en Restauración de Ecosistemas. Universidad de Alcalá.
- Chen, J., Murat, C., Oviatt, P., Wang, Y., Le Tacon, F. 2016. The black truffles *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum*. En: Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds.), True truffle (*Tuber* spp.) in the world. Switzerland, pp. 19-32.
- Cortina, J., Vilagrosa, A., Trubat, R. 2013. The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forest* 44: 719-732.
- Díaz, G., Carrillo, C., Honrubia, M. 2009. Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests* 38: 215- 227.

- Domínguez-Núñez, J.A. 2002. "Aportaciones de la micorrización artificial con trufa negra en planta forestal". Tesis Doctoral de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes en la Universidad Politécnica de Madrid.
- Fischer, C.R., Suz, L.M., Colinas, C., Bonet, J.A., Martín, M.P. 2009. Can NPK fertilizers enhance seedling growth and mycorrhizal status of *Tuber melanosporum*-inoculated *Quercus ilex* seedlings? *Mycorrhiza* 20: 349-360.
- García-Barreda, S., Molina-Grau, S., Reyna, S. 2017. Fertilization of *Quercus* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*: Effects on growth and mycorrhization of two host species and two inoculation methods. *IForest* 10: 267-272.
- García-Montero, L.G., Manjón, J.L., Pascual, C., García-Abril, A. 2007. Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. *Forest Ecology and Management* 242: 288-296.
- Gryndler, M., Šmilauer, P., Šťovíček, V., Nováková, K., Hřelová, H., Jansa, J. 2017. Truffle biogeography. A case study revealing ecological niche separation of different *Tuber* species. *Ecology and Evolution* 7: 4275-4288
- Idol, T.W., Diarra, G. 2016. Mycorrhizal colonization is compatible with exponential fertilization to improve tree seedling quality. *Journal of Plant Nutrition* 40: 283-297.
- Jaillard, B., Oliach, D., Sourzat, P., Colinas, C. 2016. Soil characteristics of *Tuber melanosporum* habitat. En: Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds.), *True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, systematics and biochemistry*. Springer, Switzerland pp. 169-190.
- Landis, T., Tinus, R., McDonald, A.J.S., Barnett, J.P. 1989. Seedling Nutrition and Irrigation. *The Container Tree Nursery Manual Vol. 4*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.
- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. MAGRAMA. 2013. Informe sobre acciones en el sector del uso del suelo, cambio de uso de suelo y selvicultura de España Madrid. MAGRAMA.

- Molinier, V., Peter, M., Stobbe, U., Egli, S. 2019. The Burgundy Truffle (*Tuber aestivum* syn. *uncinatum*): A Truffle species with a wide habitat range over Europe. En: Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. (eds.), True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, systematics and biochemistry. Springer, Switzerland pp. 169-190.
- Nadim, M., Saidi, N., Hasani, I., El, M., Assad, H. 2016. Effects of some environmental parameters on mycelia growth of Finnish truffle *Tuber maculatum*. International Journal of Engineering and Applied Sciences 3: 1-5.
- Nardini, A., Salleo, S., Tyree, M.T., Vertovec, M. 2000. Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings. Ciencias forestales. 57: 305-312.
- Nylund, J., Wallander, H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi hydroponic cultivation system. New Phytologist 112: 389-398.
- Reyna, S., García-Barreda, S. 2008. European black truffle: its potential role in agroforestry development in the marginal lands of Mediterranean calcareous mountains. En: Rigueiro Rodríguez, A., McAdam, J., Mosquera-Losada, M. (eds.), Agroforestry in Europe Current status and future prospects, Springer. Valencia (España), pp. 295-317.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Samils, N., Olivera, A., Danell, E., Alexander, S.J., Fischer, C., Colinas, C. 2008. The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. Economic Botany, 62:331-340
- Uscola, M; Villar-Salvador, P; Gross, P; Maillard, P. 2015. Fast growth involves high dependence on stored resources in seedlings of Mediterranean evergreen trees. Annals of botany 115:1001-1013
- Villar-Salvador, P., Puértolas, J., Cuesta, B., Peñuelas, J.L., Uscola, M., HerediaGuerrero, N., Rey Benayas, J.M. 2012. Increase in size and nitrogen

concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New Forests* 43: 755-770.

Villar-Salvador, P., Oliet Palá, J., Heredia Guerrero, N., Uscola Fernández, M., Goicoetxea, P. 2014a. *Quercus faginea* Lam. En: Organismos Autónomos de Parques Nacionales. Producción y manejo de semillas y plantas forestales. Organismo autónomo de parques nacionales, Madrid. pp. 206-225.

Villar-Salvador, P., Uscola, M., Jacobs, DF. 2014b. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. *New Forests* 46 (5), 813-839

Warren, C.R., Adams, M.A., Chen, Z. 2000. Is photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 407-416.

Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of Chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.

Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. 2016. True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, systematics and biochemistry. Springer, Switzerland.

9 Material suplementario

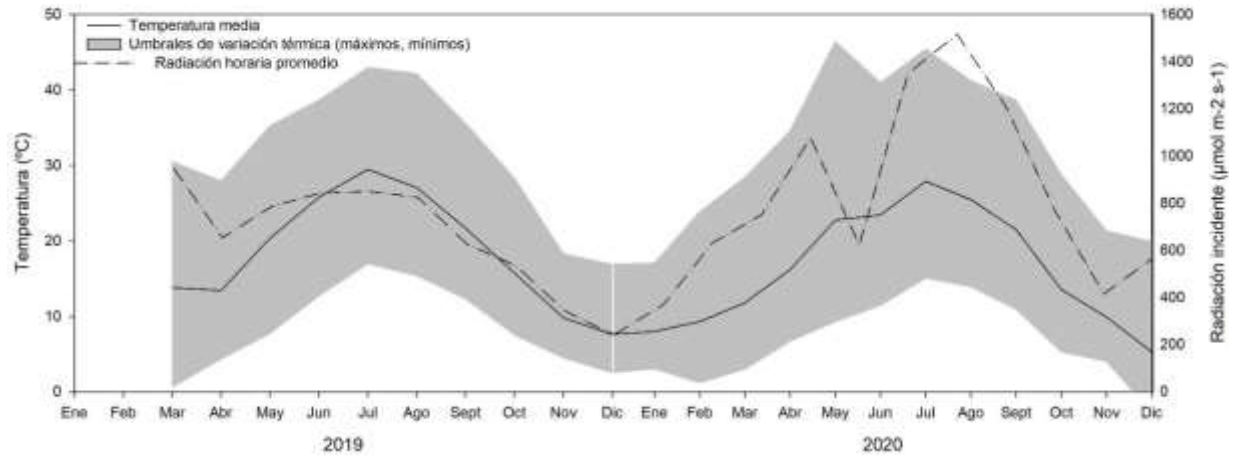


Figura S1: Temperatura diaria media (línea continua) y radiación promedio diaria (línea discontinua) durante los dos años del experimento en el interior del túnel donde se cultivaron las plantas de *Quercus faginea*. El área sombreada representa la variación térmica entre las temperaturas promedio diarias máximas y mínimas.