

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2021 204

María Martín Santafé

Plagas y enfermedades asociadas a plantaciones truferas.

Director/es

Sánchez Durán, Sergio
Barriuso Vargas, Juan José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**PLAGAS Y ENFERMEDADES ASOCIADAS A
PLANTACIONES TRUFERAS.**

Autor

María Martín Santafé

Director/es

Sánchez Durán, Sergio
Barriuso Vargas, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

PLAGAS Y ENFERMEDADES ASOCIADAS A PLANTACIONES TRUFERAS



TESIS DOCTORAL

María Martín Santafé

ENERO 2021

Tesis Doctoral

Plagas y enfermedades asociadas a plantaciones
truferas

Autor

María Martín Santafé

Director/es

Juan José Barriuso Vargas

Sergio Sánchez Durán

Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y del Medio Natural

Escuela Politécnica Superior de Huesca

2021

D. **Juan Barriuso Vargas**, Profesor del Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universidad de Zaragoza y D. **Sergio Sánchez Durán**, Investigador del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**Plagas y enfermedades asociadas a plantaciones truferas**” de la autora **María Martín Santafé** ha sido realizada bajo su dirección, que su contenido se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su momento, y que cumple con las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 12 de Enero de 2021

Fdo.: D. Juan J. Barriuso Vargas

Fdo.: D. Sergio Sánchez Durán

AGRADECIMIENTOS

Tengo que comenzar agradeciendo a la trufa todo lo que me ha dado estos años. Ha sido una etapa preciosa de conocimiento, no solo sobre el cultivo del hongo, sino también un crecimiento personal. Gracias principalmente por la gente que ha puesto en mi camino.

A mi director y a mi tutor de tesis. Juan, gracias por todo el apoyo que me has dado este tiempo. Apostaste por mí, y espero haber estado a la altura. Gracias por escuchar. Muchas veces es todo lo que se espera, y tú me has dado mucho más que eso. A Sergio, por todos los buenos ratos pasados en esas tardes de rock mirando micorrizas hasta las tantas, por los muestreos tan entretenidos y por haber sido mucho más que un compañero de trabajo.

A Sandra. ¿Qué puedo decirte? Gracias por todo el apoyo que me has dado estos años. Por cuidar tan bien mis plantas (se nota que les cantabas), por echarme un capote con los medios del infierno, y por ser mi amiga y confidente todo este tiempo. ¡Eres muy grande! A Pablo (las nueces te temen), Incausa (me encantas, sin más), María José (el V8 va de categoría), Laura (qué razón tenías...), Sergi (el rey de la estadística), Pedro (el único capaz de decir en televisión que la trufa tiene sentimientos), Rosa (tu paciencia es infinita), Luz (y pensar que todo comenzó con un póster...), Eva (la vida en un pueblo tiene sus ventajas). ¡Que viva el cocido!

A las dos primeras personas que apostaron por mí, Santiago y Carlos. No sé cómo agradecerlos tanto. Aún recuerdo el día que me llamaste, Santiago, y el que fui a hacer prácticas al laboratorio del CITA contigo, Carlos. Siempre seré “tu rusilla”. Mil gracias a los dos!

A los investigadores que he conocido, y que habéis aportado tanto conocimiento en mi vida. Los congresos hubieran sido mucho más aburridos sin vosotros.

A todos los truficultores, y cada vez más truficultoras. Empezando por los de “casa”. No voy a nombraros porque sois muchos y seguro que me dejo a alguien. Gracias por decir sí a todo, por enseñarme tanto, por apoyar los trabajos que he hecho, y dejarme sin dudar vuestras fincas. Ojalá haya servido para algo.

Pero también al resto de truficultores que he ido conociendo por el camino. Han sido muchas las charlas y cursos que he hecho estos años, y os aseguro que en todos ellos he aprendido algo de vosotros.

No podía olvidarme a la gente del Laboratorio de Sanidad Forestal. Gracias a todos. Víctor, contigo da gusto muestrear, aunque los almuerzos dejan mucho que desear (yo con un café no paso la mañana). Gracias por acompañarme en mis locuras (y por arrastrarme de vez en cuando también a las tuyas) y por pasarme todas las fotos que han hecho que esta tesis sea mucho más amena. Miguel, tus inventos son geniales. ¡Menos mal que estabas para echarme

un cable con los agujeros de las trampas! Araceli, algún día tendremos un contrato fijo. ¡No perdamos la esperanza!

A mis amigos, por sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba. Por los días de monte y las noches de pocker y rock del bueno.

A mi familia, por apoyarme siempre en todo y sin rechistar. Por echarme un cable y hacer de niños para que yo acabara esto (veis, el día iba a llegar tarde o temprano). Sois la mejor familia que se puede tener. Papás, gracias por los valores que me habéis inculcado. Esa mochila la llevaré toda la vida y será mi carta de presentación. No podíais haberlo hecho mejor.

Y por último, a mis razones para querer ser mejor cada día: Óscar y Marcos. Sois sin duda lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias, Óscar, por apoyarme incondicionalmente, por ser el orden en mi caos, y por darme lo más grande, a ese canijo que ha venido a enseñarnos tanto. ¡Lo estamos haciendo bien!

“Duele. Duele un montón. Pero va a pasar, y cuando sane, más fuerte vas a brillar, más alto vas a volar, más libre vas a soñar. Y vas a entender, que algunas historias terminan, para que otras mejores puedan empezar.”

Antoine de Saint-Exupéry, El Principito

*A Óscar y a Marcos, por
recordarme cada día qué es lo
realmente importante en la vida*

RESUMEN

La juventud de la truficultura implica un desconocimiento en muchos ámbitos del cultivo, como por ejemplo en plagas y enfermedades asociados al mismo. El aumento de la superficie dedicada a este aprovechamiento en España, unida a la intensificación del cultivo, a la mejora de la producción debida principalmente al riego, así como la realización de nuevas técnicas de manejo, ha facilitado la proliferación de agentes nocivos en plantaciones truferas.

Se ha realizado un exhaustivo trabajo de campo y bibliográfico con la intención de describir todas las patologías detectadas en plantaciones truferas hasta el momento. Han resultado más de 60 agentes nocivos. Se han seleccionado tres de ellos por su relevancia para ser investigados en profundidad: i) El hongo contaminante de vivero *Pulvinula constellatio*, hasta el momento nunca identificado en viveros de producción de planta micorrizada en España; ii) El patógeno causante de las tumoraciones en ramas y tronco de encina, identificado en el presente trabajo como un *Candidatus* Phytoplasma del grupo 16SrX; iii) El escarabajo de la trufa, *Leiodes cinnamomeus*, la plaga más importante que afecta a carpóforos, causando daños inasumibles en el sector.

Se ha podido saber que *P. constellatio* es un hongo capaz de colonizar de una forma típicamente pionera un vivero de producción de planta micorrizada, formando micorrizas y carpóforos en menos de un año. Sin embargo, no es capaz de desplazar a *Tuber melanosporum* de las raíces cuando ésta presenta porcentajes de micorrización elevados.

Pulvinula constellatio ha mostrado un comportamiento oportunista y pionero típico, habiéndose observado altas tasas de colonización de raíces cuando éstas estaban libres de otros hongos ectomicorrícicos y habiendo concluido rápidamente su ciclo de vida mediante el desarrollo de cuerpos fructíferos. La detección de sus cuerpos fructíferos es una detección tardía de la contaminación.

En cuanto al agente causal de las malformaciones tumorales de la encina, se ha identificado como un *Candidatus* Phytoplasma del grupo 16SrX, muy similar a *Candidatus* Phytoplasma prunorum. Teniendo en cuenta que estos organismos se transmiten por insectos vectores, sería necesario el conocimiento de los mismos para frenar la expansión de este síndrome en plantaciones truferas, así como en masas naturales de quercineas.

Por último, los trabajos desarrollados sobre *L. cinnamomeus* muestran que las capturas semanales aumentan cuando lo hacen la humedad del suelo y la temperatura exterior. En el estudio se observa un pico poblacional entre la primera y la última semana de noviembre, lo que conlleva un máximo de daños las semanas previas a la campaña navideña, cuando la trufa alcanza su máximo valor.

Se ha observado un comportamiento crepuscular del adulto, hecho habitual en coleópteros. Además, se ha demostrado una relación significativa entre la proporción de machos y la semana de muestreo, habiendo una prevalencia de machos a principio de la campaña, y una prevalencia de hembras al finalizar la misma, posiblemente debido a que los machos emergen unos días antes para fecundar a las hembras recién salidas. Los ratios de capturas globales entre machos y hembras han sido equitativos lo que significa que ambas especies se ven atraídas por igual por el compuesto empleado (dimetil sulfuro), no habiéndose obtenido capturas de adultos de *L. cinnamomeus* en los meses comprendidos entre mayo y septiembre, ni siquiera en zonas productoras de trufa de verano.

Se ha visto que los daños producidos por *L. cinnamomeus* en nidos (aportes puntuales de sustrato y otros elementos en el suelo) son inferiores a los observados fuera de ellos.

Con los trabajos desarrollados en la presente tesis doctoral se ha pretendido sentar las bases del conocimiento de los agentes nocivos en truficultura con el objetivo final de apoyar el futuro establecimiento de metodologías de control compatibles con la lucha integrada de plagas.

SUMMARY

The youth of truffle growing implies a lack of knowledge in many areas of cultivation, such as pests and diseases associated with it. The increase in the surface area devoted to truffle cultivation in Spain, together with the intensification of the crop, the improvement of production due mainly to irrigation, as well as the implementation of new management techniques, has facilitated the proliferation of harmful agents in truffle plantations.

An exhaustive field and bibliographic work has been carried out with the aim of describing all the pathologies detected in truffle plantations up to now. More than 60 harmful agents have been found. Three of them have been selected for their relevance to be investigated in depth: i) The polluting fungus *Pulvinula constellatio*, never identified until now in mycorrhized plant production nurseries in Spain; ii) The pathogen causing tumors in branches and trunk of holm oak, identified in this work as a *Candidatus* Phytoplasma of group 16SrX; iii) The truffle beetle, *Leiodes cinnamomeus*, the most important pest affecting carpophores, causing unconscionable damage in the sector.

It has been known that *P. constellatio* is a fungus capable of colonizing in a typically pioneering way a nursery producing mycorrhized plants, forming mycorrhizae and carpophores in less than one year. However, it is not able to displace *Tuber melanosporum* from the roots when it presents high mycorrhization percentages.

Pulvinula constellatio has shown a typical opportunistic and pioneering behavior, having observed high rates of root colonization when roots were free from other ectomycorrhizal fungi and having rapidly concluded their life cycle by developing fruiting bodies. The detection of their fruiting bodies is a late detection of contamination.

As for the causal agent of the malformations of the oak, it has been identified as a *Candidatus* Phytoplasma belonging to 16SrX group, very similar to *Candidatus* Phytoplasma prunorum. Taking into account that these organisms are transmitted by vector insects, it would be necessary to know them to stop the expansion of this syndrome in truffle plantations, as well as in natural masses.

Finally, the works developed on *L. cinnamomeus* show that weekly captures increase when soil humidity and external temperature increase. The study shows a population peak between the first and last week of November, which leads to a maximum of damage in the weeks before the Christmas season, when the truffle reaches its maximum value.

It has been observed a twilight behavior of the adult, which is common in coleoptera. In addition, a significant relationship has been demonstrated between the proportion of males and the week of sampling, with a prevalence of males at the beginning of the season, and a prevalence of females at the end of the season, possibly due to the fact that males emerge a few days earlier to fertilize the recently emerged females. The overall capture ratios between males and females have been equal, which means that both species are equally attracted to

the compound used (dimethyl sulfide). No adult of *L. cinnamomeus* has been captured in the months between May and September, not even in summer truffle producing areas.

It has been seen that the damages produced by *L. cinnamomeus* in nests (occasional contributions of substrate and other elements in the soil) are lower than those observed outside them.

With the works developed in the present doctoral thesis, it has been intended to establish the basis for the knowledge of harmful agents in truffle cultivation with the final objective of supporting the future establishment of control methodologies compatible with integrated pest control.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
-----------------------------	----------

OBJETIVOS GENERALES	21
----------------------------	-----------

CAPÍTULO 1: Situación actual de las plagas y enfermedades asociadas a plantaciones truferas

INTRODUCCIÓN	27
---------------------	-----------

OBJETIVOS	33
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS	35
---------------------------	-----------

1.- Área de trabajo y metodología	35
--	-----------

2.- Toma de datos e identificación de agentes nocivos	36
--	-----------

2.1.- Captura e identificación de insectos	36
--	----

2.2.- Identificación de hongos micorrícicos competidores	37
--	----

2.2.1.- Identificación morfológica	38
------------------------------------	----

2.2.2.- Identificación molecular	38
----------------------------------	----

2.3.- Identificación y aislamiento de hongos patógenos	39
--	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
-------------------------------	-----------

1.- Plagas asociadas a viveros	49
---------------------------------------	-----------

1.1.- Daños originados en la parte aérea	49
--	----

1.2.- Daños originados en la parte radical	50
--	----

1.3.- Daños originados en las bellotas	54
--	----

2.- Plagas asociadas a plantaciones truferas	55
---	-----------

2.1.- Daños identificados en la parte aérea	55
---	----

2.1.1.- Daños en tronco y ramas	55
---------------------------------	----

2.1.2.- Daños en hojas	60
------------------------	----

2.2.- Daños en el sistema radical	65
-----------------------------------	----

2.2.1.- Artrópodos	65
--------------------	----

2.2.2.- Enfermedades	68
----------------------	----

2.3.- Daños producidos por fauna silvestre	70
--	----

2.4.- Daños abióticos	73
-----------------------	----

2.5.- Hongos ectomicorrícicos competidores	77
--	----

2.6.- Otros problemas en plantaciones truferas	79
--	----

3.- Plagas asociadas a carpóforos	81
--	-----------

CAPÍTULO 2: Biología de <i>Pulvinula constellatio</i> (Berk. & Broome) Boud en viveros españoles de producción de planta micorrizada	85
INTRODUCCIÓN	87
OBJETIVOS	91
MATERIAL Y MÉTODOS	93
1.- Características de las plantas y del invernadero	93
2.- Identificación del hongo contaminante	95
2.1.- Caracterización morfológica	95
2.2.- Caracterización molecular	95
3.- Monitorización de la contaminación	97
3.1.- Aparición de carpóforos	97
3.2.- Análisis micorrícico de las plantas	97
4.- Cultivo <i>in vitro</i>	98
5.- Análisis estadístico	104
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
1.- Identificación del hongo contaminante	105
1.1.- Caracterización morfológica	105
1.2.- Caracterización molecular	106
2.- Comportamiento de <i>Pulvinula constellatio</i>	107
2.1.- Observación de la dinámica de carpóforos	107
2.2.- Análisis micorrícico de las plantas	111
3.- Cultivo <i>in vitro</i>	116
CAPÍTULO 3: Identificación del patógeno causante de las malformaciones tumorales en encinas en España	119
INTRODUCCIÓN	121
OBJETIVOS	127
MATERIAL Y MÉTODOS	129
1.- Material vegetal	129
1.1.- Planta sintomática	131
1.2.- Controles	133
2.- Análisis moleculares	135
2.1.- Extracción de ADN	135
2.2.- Identificación molecular	138
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143

CAPÍTULO 4 : Biología y ecología del escarabajo de la trufa (<i>Leiodes cinnamomeus</i> Panzer)	153
INTRODUCCIÓN	155
OBJETIVOS	165
MATERIAL Y MÉTODOS	167
1.- Biología y ecología de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	167
1.1.- Parcelas de estudio	167
1.2.- Captura de los adultos	168
1.3.- Diseño experimental	169
1.3.1.- Trampeo	169
1.3.2.- Determinación del vuelo	172
1.3.3.- Sex ratio de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	172
1.3.4.- Trampeo de plantaciones con trufa de verano	173
1.4.- Análisis estadístico	173
2.- Influencia de los nidos sobre los daños observados por <i>Leiodes cinnamomeus</i>	174
2.1.- Diseño experimental	174
2.1.1.- Parcela de estudio	174
2.1.2.- Metodología de toma de datos	175
2.2.- Análisis estadístico	176
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	177
1.- Biología y ecología de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	177
1.1.- Relación de temperatura y humedad vs capturas de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	177
1.2.- Determinación del vuelo de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	182
1.3.- Sex ratio en el desarrollo de la campaña	184
1.4.- Trampeo de plantaciones con trufa de verano	188
2.- Influencia de los nidos sobre los daños observados por <i>Leiodes cinnamomeus</i>	188
DISCUSIÓN GENERAL	193
CONCLUSIONES	205
BIBLIOGRAFÍA	209
ANEJOS	237
Anejo 1.- Resultados del análisis de micorrización de las plantas del invernadero del CITA (Capítulo 2)	239
Anejo 2.- Capturas obtenidas en las trampas de <i>Leiodes cinnamomeus</i> durante las campañas 2016-2017 y 2017-2018 (Capítulo 4)	253

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

INTRODUCCIÓN

Figura 0.1.- Carpóforos de <i>Tuber melanosporum</i> recién recolectados	3
Figura 0.2.- Vivero de producción de planta micorrizada con trufa negra en España	5
Figura 0.3.- Ejemplo de integración paisajística de una plantación trufera en la comarca Gúdar-Javalambre (Teruel)	6
Figura 0.4.- Larva de <i>Lymantria dispar</i> (Izquierda). Destacan sus característicos tubérculos de color azul y rojo con largos pelos. Masa forestal defoliada por larvas de <i>Euproctis chrysorrhoea</i> (Derecha)	8
Figura 0.5.- Detalle de una larva de <i>Suillia</i> con esporas de trufa en su tracto digestivo	9
Figura 0.6.- Ciclo biológico de la trufa negra (<i>Tuber melanosporum</i>). Modificado de Oliach <i>et al.</i> , 2020	15
Figura 0.7.- Diferentes malformaciones en planta de vivero que pueden comprometer la viabilidad de los lotes. A: Sistema radicular deformado. B: Tallos múltiples y ausencia de raíz pivotante. C: Sistema radicular deformado. D: Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical	18

CAPÍTULO 1

Figura 1.1.- Plantación adulta en la que se han realizado escasos trabajos de poda, lo que favorece el contacto entre las copas	28
Figura 1.2.- Grandes extensiones que presentan un monocultivo pueden favorecer el desarrollo de plagas y enfermedades	29
Figura 1.3.- Varios adultos del escarabajo de la trufa (<i>Leiodes cinnamomeus</i>) alrededor de dos carpóforos de <i>Tuber melanosporum</i> recién descubiertos	30
Figura 1.4.- Procedimiento para la captura de mosca de la trufa en plantaciones truferas. A: Trampa empleada. B: Colocación del aerosol pegajoso para en el interior de la tapa. C: Estado de la trampa una semana después de su colocación. D: Detalle de las moscas capturadas	37
Figura 1.5.- Batería de aislados de plantas sintomáticas (Izquierda). Detalle de placa con aislados de <i>Armillaria mellea</i> (Derecha)	40
Tabla 1.1.- Relación de todas las plagas y enfermedades identificadas en el presente capítulo, en la que se describe la zona de la planta afectada, el agente nocivo causante de la enfermedad, las pautas para la identificación, la incidencia según tres niveles cualitativos (media-alta-baja), el nivel de daño que supone la plaga cuando hay un ataque en tres niveles cualitativos (alto-medio-bajo), y las consecuencias que supone la presencia del agente nocivo	42
Figura 1.6.- Oidio en plántulas de invernadero (A). Síntomas de erinosis producidas por el ácaro <i>Aceria ilicis</i> (B). <i>Phylloxera quercus</i> en hojas de quejigo (<i>Quercus faginea</i>) en vivero (C). Daños causados por <i>Phyllonorycter belotella</i> en encina (D)	50

Figura 1.7.- Tallo seccionado debido a la alimentación de las larvas de <i>Otiorrhinchus sulcatus</i> en planta de vivero (Izquierda). Síntomas de la planta atacada por este insecto (Derecha)	51
Figura 1.8.- Carpóforos de <i>Sphaerospora brunnea</i> en plántones micorrizados con <i>Tuber melanosporum</i>	52
Figura 1.9.- Micorrizas pertenecientes al Complejo <i>Tuber borchii</i> (Izquierda), y a <i>Trichophaea woolhopeia</i> (Derecha)	52
Figura 1.10.- Micorrizas de <i>Tuber brumale</i> (Izquierda) y de <i>Tuber aestivum</i> (Derecha)	53
Figura 1.11.- Imagen a estereoscopio de micorrizas de <i>Pulvinula constellatio</i>	53
Figura 1.12.- Larva de curculiónido en el interior de una bellota (Izquierda). Orificio de salida (Derecha)	54
Figura 1.13.- Daños provocados por ratones en bellotas, donde han seccionado la raíz pivotante (Izquierda). Estado de los alveolos después de un ataque de ratón en un vivero de producción de planta micorrizada (Derecha)	55
Figura 1.14.- Árbol afectado por <i>Kermes vermilio</i> en el que se observan ramillas secas (Izquierda). Detalle de rama con ninfas (naranja) y capullos blancos protectores de los machos (blanco) (Derecha)	56
Figura 1.15.- <i>Targionia vitis</i> en tronco de encina	56
Figura 1.16.- Daños característicos producidos por larvas de <i>Coroebus florentinus</i> , que causan anillamiento de las ramas (A). Larva de <i>Zeuzera pyrina</i> en el interior de una rama de encina (B). Adulto de cerambícido sobre encina (C). Galerías de salida de cerambícido (D)	58
Figura 1.17.- <i>Brenneria quercina</i> . Imagen de exudado en tronco (Izquierda). Detalle de exudación "salivosa" (Derecha)	59
Figura 1.18.- Síntomas producidos por <i>Taphrina kruchii</i> en escoba de brujas (Izquierda) y por <i>Botryosphaeria stevensii</i> , provocando un característico mosaico en tronco (Derecha)	59
Figura 1.19.- Orugas recién nacidas de <i>Lymantria dispar</i> sobre su capullo sedoso (A). Daños producidos por de <i>L. dispar</i> en monte (B). Larva de <i>Tortrix viidiana</i> alimentándose de encina (C). Orugas recién nacidas de <i>Euproctis chrysorrhoea</i> sobre su capullo sedoso (D)	60
Figura 1.20.- Adulto de <i>Lachnaia hirta</i> (A). Adulto de <i>Labidostomis spp.</i> (B). Daños característicos derivados de la alimentación de <i>Polydrusus setifrons</i> en encina (C). Adulto de <i>Tropinota squalida</i> en una plantación trufera (D)	61
Figura 1.21.- Daños producido por el lepidóptero <i>Acrocercops brongniardellus</i> (Izquierda). Característica puesta producida por <i>Attelabus nitens</i> en forma de canutillo (derecha)	62
Figura 1.22.- Hojas de encina mostrando síntomas de afección del répilo de la encina (<i>Venturia oleaginea</i>)	63
Figura 1.23.- Diferentes pulgones presentes en plantaciones truferas españolas. Grupo de pulgones de la especie <i>Lachnus longirostris</i> afectando a encina (Izquierda). <i>Myzocallis boernerii</i> en plántones de encina (derecha)	64

Figura 1. 24.- Diferentes agallas en quercineas. <i>Andricus quercustozae</i> en quejigo (A y B). <i>Plagiotrochus quercusilicis</i> en encina (C). <i>Andricus quercusramuli</i> en quejigo (D)	65
Figura 1.25.- <i>Vesperus</i> en plantaciones truferas. Detalle de mandíbulas de larva (A), Adultos de macho y hembra (B). Detalle de tallo seccionado por larvas de <i>Vesperus</i> (C). Planta muerta por ataque de <i>Vesperus</i> (D)	66
Figura 1.26.- Larvas del bupréstido <i>Capnodis tenebrionis</i>	68
Figura 1.27.- Topillo capturado en una plantación trufera (Izquierda). Daños ocasionados por estos mamíferos, seccionando por completo el pie afectado (Derecha)	68
Figura 1.28.- Trabajos realizados con <i>Armillaria mellea</i> en el transcurso de esta tesis doctoral. Rizomorfos observables a simple vista en raíces de plantas de campo afectadas por este hongo (A). Enfrentamiento <i>in vitro</i> de <i>Armillaria</i> con <i>Trichoderma harzianum</i> (B). Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Armillaria</i> (C y D)	69
Figura 1.29.- Daños provocados por jabalí (Izquierda) y por tejón (Derecha) en una plantación trufera	71
Figura 1.30.- Daños provocados por cabras en encina (Izquierda) y corzos en quejigo (Derecha). A la izquierda se puede observar la completa defoliación, así como el descortezado del tronco asociado al roce de la cornamenta. A la derecha se puede observar la presión ejercida sobre el único quejigo de una plantación de carrascas de cuatro años	72
Figura 1.31.- Daños provocados por conejos en una plantación trufera (Izquierda). Protector colocado en una encina para evitar los daños producidos por conejos (Derecha)	72
Figura 1.32.- Riego helado (Izquierda). Efectos de una helada intensa tras haber brotado una encina (Derecha)	73
Figura 1.33.- Cicatrices en rama de encina producidas por granizo	74
Figura 1.34.- Rama rota a causa de una intensa nevada acontecida en la Comarca Gúdar-Javalambre (Teruel)	75
Figura 1.35.- Pie de encina trufera con severos daños provocados por falta de adaptación	75
Figura 1.36.- Planta con problemas de adaptación, en la que se puede observar enanismo y clorosis	76
Figura 1.37.- Consecuencia del empleo de un contenedor no adecuado para la gestión de la plantación. Sintomatología de la planta (Izquierda). Presencia del Melfert intacto tras seis años de cultivo (Derecha)	77
Figura 1.38.- Diferentes hongos presentes frecuentemente en plantaciones truferas. Estrella de tierra, <i>Geastrum</i> sp. (A). <i>Pisolithus arhizus</i> (B). Detalle de peridio descortezado en un carpóforo de <i>Tuber brumale</i> (C). Carpóforo de <i>Genea</i> (D)	79
Figura 1.39.- Proliferación de caracoles en una plantación trufera	80
Figura 1.40.- Avispero en el interior de un protector	80
Figura 1.41.- Adulto de la mosca de la trufa	82
Figura 1.42.- Trufa negra atacada por <i>Leiodes cinnamomeus</i> . Pueden observarse las galerías y refugio, así como las propias larvas en su interior	83

CAPÍTULO 2

Figura 2.1.- Carpóforos de <i>Sphaerosporella brunnea</i> en la superficie de un contenedor de planta micorrizada con <i>Tuber melanosporum</i>	88
Figura 2.2.- Carpóforos anaranjados en los contenedores Full Pot® donde se cultiva planta inoculada con <i>Tuber melanosporum</i> y <i>Tuber aestivum</i> en el invernadero del CITA del Gobierno de Aragón	89
Figura 2.3.- Esquema de contaminación en los tres cuerpos del invernadero. En el interior de cada caja se indica el número de plantas presentes	94
Tabla 2.1.- Cebadores empleados para la identificación de <i>Pulvinula constellatio</i>	96
Tabla 2.2.- Plantas analizadas de cada lote presente en el invernadero cuando se produjo la contaminación clasificadas en función del año de inoculación, la especie de trufa inoculada y la presencia de apotecios de <i>Pulvinula constellatio</i> en la superficie del contenedor	98
Tabla 2.3.- Tratamientos de desinfección realizados con etanol+hipoclorito de sodio, y solamente con NaClO	102
Tabla 2.4.- Componentes de los diferentes medios empleados en el presente trabajo que, de acuerdo a la bibliografía, permiten el crecimiento de otros hongos micorrícicos. Las unidades son g/L excepto en los casos en los que se indica otra unidad	103
Figura 2.4.- Apotecios desarrollándose en contenedor de planta micorrizada (Izquierda). Ascas y paráfisis de <i>Pulvinula constellatio</i> a microscopio (Derecha)	105
Figura 2.5.- Micorriza de <i>Pulvinula constellatio</i> . A: Imagen general de raíz con ectomicorrizas bajo microscopio estereoscópico. B: Detalle de micorriza de <i>Pulvinula</i> bajo microscopio estereoscópico, donde pueden observarse una gran cantidad de hifas y partículas adheridas. C: Detalle del manto bajo microscopio óptico. D: Detalle de hifas con exudados	106
Figura 2.6.- Resultados de la monitorización de la aparición de carpóforos de <i>Pulvinula constellatio</i> en el invernadero. Dentro de cada caja representada se indica el número de plantas total de cada caja/el número de plantas en las que aparecieron carpóforos de <i>P. constellatio</i>	108
Tabla 2.5.- Frecuencia media pronosticada por el modelo GLM de aparición de carpóforos de <i>Pulvinula constellatio</i> en contenedores para los lotes de plántulas presentes en el invernadero cuando se produjo la contaminación. Los valores estimados en la tabla son en tanto por uno. Los lotes con valores que no comparten letras tienen diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$; método de medias de mínimos cuadrados)	109
Figura 2.7.- Porcentaje de contenedores con carpóforos de <i>Pulvinula</i> dentro de cada lote frente al porcentaje de micorrización por <i>Tuber</i> del mismo	110
Tabla 2.6.- Frecuencia media pronosticada de ápices micorrizados por <i>Pulvinula constellatio</i> estimado en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero cuando se produjo la contaminación. Los lotes con valores que no comparten letras tienen diferencias significativas entre sí (medias de mínimos cuadrados e intervalo de confianza del 95%). Los valores estimados son en tanto por uno	111

Tabla 2.7.- Porcentajes de ápices micorrizados medios contabilizados por <i>Pulvinula constellatio</i> (% <i>Pulvinula</i>), por <i>Tuber melanosporum</i> (%TM) y por <i>Tuber aestivum</i> (%TA) para cada uno de los lotes del ensayo	112
Tabla 2.8.- Frecuencia media pronosticada de presencia de micorrizas y carpóforos de <i>Pulvinula constellatio</i> estimado en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero (medias de mínimos cuadrados e intervalo de confianza del 95%). Los valores estimados son en tanto por uno	115
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1.- Sintomatología característica de pies afectados por este agente patógeno. Encina que presenta masas tumorales en la práctica totalidad de sus ramas, así como una incipiente defoliación y hojas cloróticas (Izquierda). Herida abierta en tronco de encina que presenta sintomatología de esta enfermedad (Derecha)	121
Figura 3.2.- Plantas jóvenes afectadas por las tumoraciones. A: Pie clorótico; B: Planta que sufre un decaimiento generalizado; C: Tumores que aparecen desde la base del tronco; D: Perforaciones provocadas por plagas secundarias en un pie que presenta tumores desde la base del tronco	122
Figura 3.3.- Larvas de <i>Kermes ilicis</i> (naranja) sobre una malformación tumoral en pie de <i>Quercus ilex</i>	125
Figura 3.4.- Mapa de ubicación de las parcelas en las que se obtuvo el material vegetal sintomático para la identificación del agente causal mediante análisis moleculares	129
Tabla 3.1.- Muestras procesadas en los trabajos llevados a cabo en función de la estación (primavera/otoño), el año (2011, 2012 o 2013), la procedencia (vivero/plantación), comentarios sobre su elección y el origen de la muestra en función de la parte del árbol (raíz, yema, peciolo, floema, corteza, nervio, brotes o rebrote)	131
Figura 3.5.- Plantas de cinco savias mantenidas en invernadero. Se observan señaladas con una flecha las malformaciones tumorales desarrollándose en el tallo	132
Figura 3.6.- Malformación tumoral en rama de árbol adulto procedente de una plantación trufera. No se observa necrosis en el corte transversal	133
Figura 3.7.- Autorrepicado de los plantones en cajas enrejilladas con vermiculita del número 3 al contactar con el aire	134
Figura 3.8.- Preparación de una muestra de tallo para su procesado	136
Tabla 3.2.- Procedimiento de extracción de ADN de material vegetal procedente de encinas (<i>Quercus ilex</i>) sintomáticas	137
Tabla 3.3.- Cebadores empleados para la identificación de fitoplasmas	138
Tabla 3.4.- Mix de PCR la primera amplificación para la identificación del agente causal de las tumoraciones en encinas	139
Tabla 3.5.- Cebadores universales empleados para la identificación de fitoplasmas en la segunda amplificación de la PCR anidada	139
Figura 3.9.- Carga del gel de agarosa para la electroforesis	140

Figura 3.10.- Esquema de funcionamiento de una PCR cuantitativa (PCR a Tiempo Real) con las sondas TaqMan	141
Tabla 3.6.- Secuencias de los cebadores y la sonda TaqMan empleados para la identificación del agente causal de las malformaciones tumorales a través de una PCR a tiempo real	141
Tabla 3.7.- Mezcla empleada para la identificación del agente causal de las malformaciones tumorales en España a partir de una PCR a tiempo real	142
Figura 3.11.- Diagrama de amplificación de la fluorescencia normalizada (Rn) de muestras de encinas sintomáticas. A: Muestras de brotes; B: Muestras de nervios de hojas y tallos; C: control positivo; D: control negativo	143
Figura 3.12.- Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) del producto final de la PCR anidada. Muestras: Escalera (a, t); Peciolo (b, f, g, h); brotes apicales (c); floema (d, e, i, j, k); nervadura (l); brotes (m, n, o, p); control positivo (r, s); control negativo (q)	144
Tabla 3.8.- Resultados de las muestras analizadas mediante PCR anidada y PCR a tiempo real en diferentes periodos vegetativos (primavera y otoño) y diferentes años (2011,2012 y 2013).(-): negativo; (+): positivo débil; (++): positivo; (+++): positivo intenso	145
Figura 3.13.- Secuencia del resultado de la PCR anidada obtenida a partir de muestras de yemas apicales en otoño de 2012	146
Figura 3.14.- Resultado del BLAST en GenBank de la secuencia obtenida en el presente trabajo, donde destaca el elevado porcentaje de identidad con otros fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrX (Julio 2020)	146
Figura 3.15.- Machos de <i>Kermes ilicis</i> (blanco) sobre encina	147
Figura 3.16.- Plantas adventicias en el entorno de un invernadero donde se produce planta micorrizada con trufa negra. Estas hierbas pueden suponer un refugio para los insectos vectores del fitoplasma	150
Figura 3.17.- Rama rota en una encina que presenta tumores tras una intensa nevada en la Comarca Gúdar-Javalambre (Teruel), en febrero de 201	151

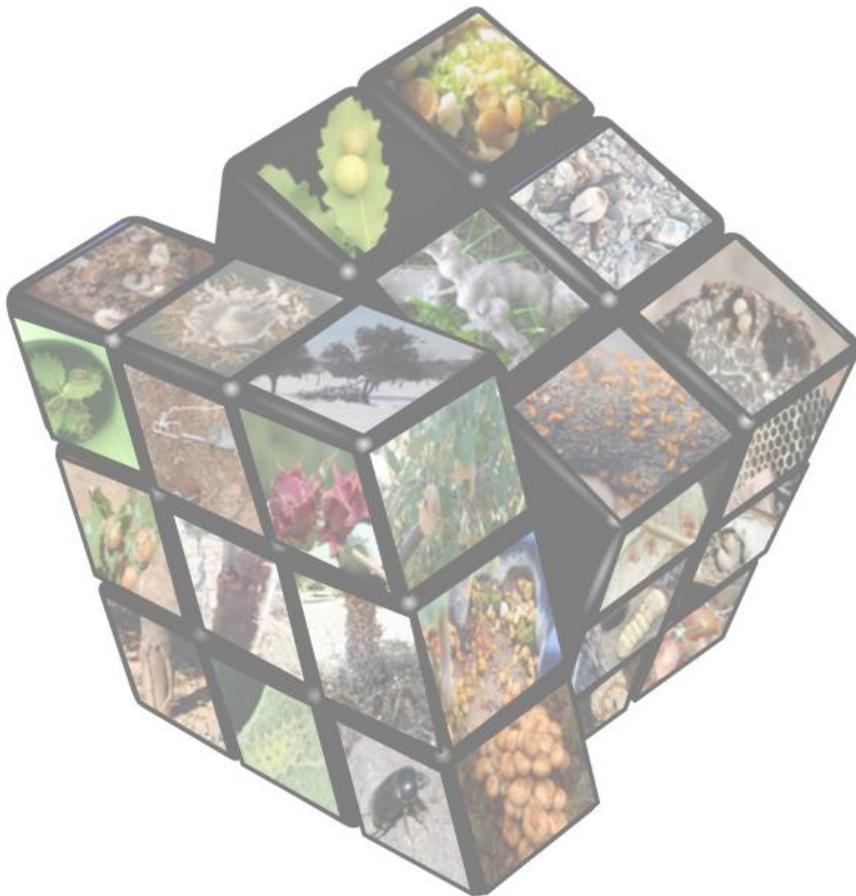
CAPÍTULO 4

Figura 4.1.- Carpóforo de <i>Tuber melanosporum</i> parasitado por <i>Leiodes cinnamomeus</i>	156
Figura 4.2.- Características de adultos de <i>Leiodes cinnamomeus</i> . Hembra (A), macho (B), detalle de antena (C). D: fémur de macho con el gancho (D izda. 1) y tibia curvada (D izda. 2). Fémur de hembra con la tibia recta (D dcha.)	157
Tabla 4.1.- Estadios de <i>Leiodes cinnamomeus</i> , duración de cada uno de ellos y fechas en las que tienen lugar en España en función de los estudios realizados por Pérez-Andueza (2015a)	158
Figura 4.3.- Huevos de <i>Leiodes cinnamomeus</i> entre partículas de suelo	158
Figura 4.4.- Huevos (Izquierda) y larva (Derecha) de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	159
Figura 4.5.- Diferentes estadios larvarios de <i>Leiodes cinnamomeus</i> en un mismo carpóforo	160

Figura 4.6.- Capullo terroso que sirve como refugio a las larvas diapausantes de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	160
Figura 4.7.- Trampas empleadas en la captura masiva de <i>Leiodes cinnamomeus</i> para la disminución de daños en carpóforos	162
Figura 4.8.- Práctica de nidos con barrena en una plantación trufera	163
Figura 4.9.- Mapa de ubicación de las plantaciones muestreadas	167
Figura 4.10.- Trampas con las que se realizaron las capturas de <i>Leiodes cinnamomeus</i>	168
Figura 4.11.- Muestreo de las trampas colocadas en una de las plantaciones colaboradoras	169
Figura 4.12.- Sondas de temperatura y humedad empleadas para la captura de datos ambientales	171
Tabla 4.2.- Disposición de los sensores de humedad y temperatura en las parcelas de estudio durante las dos campañas de estudio. T5sub: sensor de temperatura enterrado a 5cm; T15-20sub: sensor de temperatura enterrado entre 15 y 20 cm; T30sub: sensor de temperatura enterrado a 30cm; H15sub: sensor de humedad enterrado a 15cm; H30sub: sensor de humedad enterrado a 30cm; Text: sensor de temperatura a temperatura ambiente	171
Tabla 4.3.- Características de los diferentes modelos GAM (Pedersen et al., 2019) analizados	173
Tabla 4.4.- Textura de las tres parcelas de estudio. Método sedimentación, Unidades % p/p	174
Tabla 4.5.- Fechas de muestreo de las tres parcelas de estudio durante las dos campañas	176
Tabla 4.6.- Resumen de los datos de capturas obtenidos a lo largo de las dos campañas de estudio, 2016-2017 y 2017-2018	178
Figura 4.13.- Representación gráfica del modelo en el que se muestran las capturas por trampa en la campaña 2017-2018 en función de la humedad del suelo a 15 cm de profundidad. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=678; $\alpha=0,05$)	179
Figura 4.14.- Representación gráfica del modelo de en la que se muestran las capturas por trampa en función de la temperatura media exterior en la campaña 2017-2018. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=678; $\alpha=0,05$)	179
Figura 4.15.- Modelo gráfico del diseño en el que se representan las capturas por trampa y semana para cada una de las parcelas de estudio. 1: parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=678; $\alpha=0,05$)	180
Figura 4.16.- Capturas por trampa en función de la temperatura media del aire para las dos campañas estudiadas. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=926 $\alpha=0,05$)	180
Figura 4.17.- Representación gráfica del modelo: capturas por trampa y semana en cada una de las parcelas durante las dos campañas de estudio. Los números 1, 2 y 3 hacen relación a cada una de las parcelas de estudio. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n= 926; $\alpha=0,05$)	181

- Tabla 4.7.- Total de capturas en el ensayo de horas de vuelo realizado en la campaña 2016-2017 en la que se vaciaron un total de 30 trampas durante 24 horas consecutivas tres periodos de tiempo diferentes. Las trampas que no tuvieron capturas no aparecen reflejadas en la tabla 183
- Tabla 4.8.- Capturas de adultos y resultados del sexado de los mismos en cada una de las parcelas y en global para cada campaña de muestreo 185
- Tabla 4.9.- ANOVA de la relación de machos capturados en las trampas contabilizadas a lo largo de la segunda campaña de muestreo con las variables Semana, Semana+parcela, Temperatura máxima del aire y Humedad relativa mínima a una profundidad de 15cm. Los asteriscos indican niveles de significación (0:***; 0,001:**; 0,1:*). N=428 185
- Figura 4.18.- Representación gráfica del modelo: machos capturados en función de las semanas y las parcelas en la campaña 017-2018. 1: Parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error (zona sombreada) que indican el 95% de intervalo de confianza (n=428; $\alpha=0,05$) 186
- Tabla 4.10.- ANOVA de la relación de machos capturados en las trampas contabilizadas a lo largo de la segunda campaña de muestreo con las variables Semana, Parcela, Semana+parcelas y Parcela+campaña. Los asteriscos indican niveles de significación (0:***; 0,001:**; 0,1:*). N=665 187
- Figura 4.19.- Representación gráfica del modelo: machos capturados en función de las semanas y las parcelas en las dos campañas de estudio. 1: Parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error (zona sombreada) que indican el 95% de intervalo de confianza (n=665; $\alpha=0,05$) 187
- Tabla 4.11.- Número de carpóforos de *Tuber melanosporum* recolectados en cada una de las subparcelas durante las dos campañas de muestreo en función de su recolección en nidos o en tierra 189
- Tabla 4.12.- Modelo GAM seleccionado por su menor AIC para la proporción de carpóforos dañados por *Leiodes cinnamomeus* (n=1865). Desviación explicada: 9,5%. P-valores ajustados con una corrección Holm-Bonferroni para comparaciones múltiples. Gl: grados de libertad 190
- Figura 4.20.- Frecuencia de aparición de trufas dañadas por *Leiodes cinnamomeus* en función de su procedencia (tierra / nido). Las barras representan la desviación típica a un 95% de confianza. Los datos han sido agrupados para las tres subparcelas de estudio. Predicciones del modelo GAM con N=1865 y $\alpha=0,05$ 190
- Figura 4.21.- Carpóforo recolectado en la pared de un pozo, habiéndose desarrollado parte de su superficie en la turba, y la otra parte en la tierra 191

INTRODUCCIÓN GENERAL



1.- Relevancia de la trufa y truficultura en la actualidad

La trufa negra es la fructificación de un hongo ascomiceto hipogeo (*Tuber melanosporum* Vittad.) que establece relaciones simbióticas con diferentes especies de espermatofitas, principalmente del género *Quercus*, aunque también es capaz de formar micorrizas con especies de otros géneros, como *Tilia*, *Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya* o *Pinus* (Olivier *et al.*, 2012). Las principales especies huésped en España son *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp., *Quercus faginea* Lam., *Quercus coccifera* L., *Quercus humilis* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop. y *Corylus avellana* L. (Etayo *et al.*, 1999). Sin embargo, por su plasticidad ecológica, su porte, su facilidad de manejo, y por sus elevados rendimientos en la producción de trufa, es la encina (*Q. ilex*) el simbionte más empleado en plantaciones truferas.

Aunque el término trufa se emplea como referencia a hongos hipogeos, lo común es usarlo para referirse a las especies englobadas dentro del género *Tuber*. Hay multitud de especies dentro de este género. Bonito *et al.*, (2010) presentan al menos la existencia de 180 especies alrededor del mundo, aunque solamente 13 de ellas tienen interés comercial (Bonito *et al.*, 2009). Entre todas ellas la trufa negra (Fig. 0.1) destaca por su intenso aroma, por la domesticación de su cultivo y por los precios que alcanza en el mercado (entre 100 y 500€ en la campaña 2018-2019 y entre 310 y 395€ en la campaña 2019-2020 en el mercado de la trufa de La Estación de Mora (<https://trufadeteruel.com/atruiter/asociados/mercados-de-la-trufa-fresca/>)). Ésta no es la única trufa comercializable en nuestro país; otras trufas como *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng. o *T. brumale* Vittad. también son susceptibles de ser recolectadas y comercializadas (De Román y Boa, 2003; Oliach *et al.*, 2020). Sin embargo, su inferior precio (ente 25 y 50€ al productor), así como el menor conocimiento sobre su cultivo ha focalizado todos los esfuerzos por parte de truficultores e investigadores hacia una mejora en la producción de *T. melanosporum*.



Figura 0.1.- Carpóforos de *Tuber melanosporum* recién recolectados.

El hábitat original de la trufa negra son las regiones con clima mediterráneo templado húmedo o frío subhúmedo de Europa, principalmente España, Italia y Francia, aunque también en otros países del este, como Hungría o la antigua Yugoslavia (Morcillo *et al.*, 2015). Sin embargo, otras zonas del mundo presentan un clima mediterráneo compatible con la producción de trufa, como son Estados Unidos, Canadá, Chile, Nueva Zelanda y Australia (Hall *et al.*, 1996; Garland, 1999; Hall *et al.*, 2003; Elen, 2007), aunque en el hemisferio sur los suelos con pH elevado no son tan frecuentes como en Europa. Por este motivo se han desarrollado técnicas para modificarlos en función de los requerimientos de la trufa negra. En suelos ácidos que recubren suelos con pH elevado o caliza muy fragmentada es suficiente un laboreo profundo seguido por el empleo de una grada de dientes. Para suelos con pH bajo con subsuelo con las mismas características se incorporan grandes cantidades de caliza activa, añadiendo una vez se haya alcanzado el pH deseado esquilas de caliza para amortiguarlo (Hall *et al.*, 2009).

En el plano económico es necesario hacer referencia a la insuficiencia de la producción de acuerdo con la demanda. A pesar de los esfuerzos de los productores, la demanda europea y mundial de trufas de calidad hoy en día no está cubierta. A comienzos del siglo pasado, el mercado absorbía sin ningún tipo de problemas cantidades del orden de las mil toneladas (Olivier *et al.*, 2012), aun existiendo precariedad en los medios de transporte de entonces y teniendo niveles de vida muy inferiores a los actuales. En los años climáticamente normales, la producción europea y/o mundial de trufa negra de invierno (*T. melanosporum*) asciende a una cantidad cercana a las 100 toneladas (Olivier *et al.*, 2012), lo que representa solamente un 10% de la demanda a nivel mundial.

Países como Francia e Italia tienen una marcada tradición trufera, aunque España hasta la década de 1960 no entró en el mercado internacional, etapa en la cual las trufas silvestres comenzaron a ser objeto de explotación (Reyna y García-Barreda, 2014).

En este periodo se empezó a conocer la trufa silvestre en España a raíz de la presencia de buscadores de otras regiones, por lo que también se comenzó a tener conocimiento de la riqueza que poseían los montes calcícolas del territorio. La trufa podía ofrecerles uno de los recursos forestales mediterráneos más rentables, localizada principalmente en comarcas de montaña, con pocas alternativas agroforestales rentables. De esta forma comenzó la explotación de la trufa como recurso en las zonas silvestres, que tuvo una alta producción hasta los años 70 y 80. A partir de esta etapa, según coinciden recolectores y expertos, la producción de trufa silvestre en España sufrió un declive (Reyna 2012).

Este hecho empujó a la domesticación de la trufa para la creación de las primeras plantaciones trufas. Aunque otras especies de trufa han sido cultivadas, como pueden ser la trufa de verano (*T. aestivum*) (Chevalier y Frochot, 1997), el "bianchetto" (*Tuber borchii* Vittad.) (Zambonelli *et al.*, 2000) y el complejo *Tuber indicum* (Hu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), los esfuerzos en España hasta el momento se han centrado en el cultivo de *T.*

melanosporum debido al éxito en la domesticación en vivero y plantaciones, así como a su elevada rentabilidad.

A finales de los años 70, la labor conjunta entre la universidad y el IPLA de Turín con el INRA de Clermont-Ferrand (Chevalier y Grente, 1978), permitió el establecimiento de un método para la producción de plata micorrizada con trufa negra. A partir de este momento comienza a desarrollarse un cultivo hasta entonces desconocido, la truficultura.

Las primeras plantaciones truferas fueron llevadas a cabo en Francia en el S. XIX (Olivier *et al.*, 2012). Desde entonces, el número de plantaciones llevadas a cabo en el mundo crece cada año. Ya no solamente en la cuenca mediterránea, donde la trufa negra es originaria, sino en otras regiones del mundo en las que se ha introducido (Reyna y García-Barreda, 2014).

En España, las primeras plantaciones truferas se realizaron con material vegetal procedente de Francia. No fue hasta los años 80 cuando se implementó la producción controlada en vivero de planta micorrizada en España (Rodríguez *et al.*, 1989). Las ayudas económicas por parte de la administración (principalmente a partir de la Política Agraria Comunitaria), así como el apoyo recibido por las Comunidades Autónomas y las Administraciones Locales, impulsaron el cultivo de la trufa (Palazón y Barriuso, 2012). Este hecho, unido a una regresión de la producción de trufa en los montes españoles durante la década de los 70 y 80 (Reyna, 2012), favoreció la proliferación de plantaciones truferas en el territorio español.

Sin embargo, la cantidad de plantaciones llevadas a cabo en España fue mínima hasta la década de los 90, momento en el cual comenzaron a formarse las primeras asociaciones de truficultores y la administración se implicó en esta actividad, como ya se ha indicado, a través de ayudas para el establecimiento de plantaciones. Desde este momento, el número de viveros en España (Fig. 0.2) aumentó, alcanzando el número de 27 en 2013, de los cuales más del 40% se encontraban en Aragón (Cocina *et al.*, 2013).



Figura 0.2.- Vivero de producción de planta micorrizada con trufa negra en España.

España es en la actualidad el principal productor de trufa negra. La truficultura ha supuesto una fuente de recursos importante en territorios poco productivos que además están sufriendo los efectos de la despoblación. El cultivo de trufa ofrece en estas zonas una opción agronómica viable, sostenible y rentable, no solo a través de la venta de los carpóforos, sino también gracias a los beneficios indirectos obtenidos de este recurso (Samils *et al.*, 2008), habiendo aflorado empresas dedicadas a la producción de planta, venta de producto elaborado y turismo asociado a la trufa y su consumo (Albisu *et al.*, 2016).

La posibilidad de establecer plantaciones en territorios donde cualquier cultivo resulta poco viable, está contribuyendo a la forestación de superficies agrarias, con la introducción de especies forestales autóctonas, frondosas micorrizadas, como la encina, el quejigo o el roble, lo que evita la erosión, contribuye a la formación de paisaje (Fig. 0.3) y favorece la formación del suelo. Además, hay que significar que la truficultura constituye un medio de revalorizar los terrenos dedicados a dicho fin, la mayoría de las veces en situación de abandono. El potencial español en ese sentido es muy amplio, con muchos miles de hectáreas que afectan a terrenos forestales o escasamente explotados, favorables por clima y suelo al desarrollo de dicha actividad. Así lo demuestran diversos mapas de hábitat y potencialidad de cultivo realizados en los últimos años para algunas de las principales zonas truferas de nuestro país (Honrubia *et al.*, 2006; Colinas *et al.*, 2007; Alonso-Ponce *et al.*, 2010; Serrano-Notivoli *et al.*, 2015a, 2015b Lahoz, 2015).



Figura 0.3.- Ejemplo de integración paisajística de una plantación trufera en la comarca Gúdar-Javalambre (Teruel).

Uno de estos ejemplos es la provincia de Teruel, y más concretamente la Comarca de Gúdar-Javalambre. Se trata de un territorio que ha sufrido significativamente los efectos de la despoblación ya iniciada en la década de los 50. Su economía ha sido tradicionalmente basada en el turismo. Sin embargo, en estas últimas décadas *T. melanosporum* se ha convertido en uno de los principales motores del desarrollo. En esta comarca la truficultura ha permitido la fijación de población, y un nivel de vida no alcanzable con los recursos tradicionales.

Poco a poco este cultivo ha ido incrementándose y tecnificándose en esta región, concentrando en la actualidad el 60-70% de la superficie cultivada en España (Oliach *et al.*, 2020). Todo ello desemboca en una clara situación de monocultivo que está favoreciendo la aparición de plagas que en un ecosistema equilibrado no deberían existir como tales.

2.- Plagas y enfermedades en masas forestales y plantaciones

Los daños producidos por el Phylum Arthropoda son frecuentes en masas forestales y en plantaciones. Este hecho es lógico, ya que, con más de un millón de especies descritas, es el grupo del reino animal más grande, englobando aproximadamente el 80% de todas las especies pertenecientes a dicho reino (Zhang, 2011; Zhang, 2013). Dentro de este, la clase insecta representa el 80% de todos los artrópodos con un total de 1.070.781 especies conocidas (Zhang, 2013). Los insectos están presentes en todos los ecosistemas terrestres desempeñando importantes funciones ecológicas. Así, algunos son beneficiosos para el hombre, mientras que otros provocan perjuicios como la transmisión de enfermedades y pueden ser causantes de importantes plagas para la agricultura y los bosques (Leal, 2013).

Entre ellos en las masas forestales españolas destacan los daños producidos por insectos defoliadores (Fig. 0.4), principalmente *Tortrix viridana* (Linnaeus, 1758), *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758), *Malacosoma neustria* (Linnaeus, 1758) y *Euproctis chrysorrhoea* (Linnaeus, 1758), por barrenadores como *Coroebus florentinus* (Herbst, 1801) y *Cerambyx cerdo* (Linnaeus, 1758).

También son frecuentes hongos como *Taphrina kruchii* (Vuill.) Schroet Kruchii (Vuill.) Socc. y *D. mutila* o *Armillaria mellea* (Vahl.) P. Kumm. Führ. Pilzk. (Zerbst) y el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands.



Figura 0.4.- Larva de *Lymantria dispar* (Izquierda). Destacan sus característicos tubérculos de color azul y rojo con largos pelos. Masa forestal defoliada por larvas de *Euproctis chrysorrhoea* (Derecha).

Todos estos organismos son capaces de debilitar el pie simbiote, e incluso llegar a causarle la muerte. Sin embargo, cabe destacar también la presencia de insectos micófagos en las zonas productoras de trufa negra. La trufa es un hongo hipogeo, por lo que los animales que se alimentan de esporocarpos, denominados por Pacioni (1989) como “*hidnophagous*”, tienen un papel indispensable en el ciclo biológico de *T. melanosporum*, así como de los hongos hipogeos en general (Johnson, 1994). El hábitat hipogeo de estos hongos conlleva que carezcan de mecanismos propios de dispersión de esporas, por lo que dependen del deterioro del propio carpóforo, y sobre todo de animales vectores que ingieran y dispersen las esporas (Reyna *et al.*, 2012).

Estos hongos cuando alcanzan la madurez esporal emiten compuestos volátiles que facilitan su localización por los micófagos (Talou *et al.*, 1990; Pacioni *et al.* 1991; Bratek *et al.*, 1992; Hochberg *et al.*, 2003). Estos aromas permiten la detección de los hongos por parte de la fauna micófaga. Además, estas esporas ven incluso incrementada su viabilidad (Miller, 1985), siendo una óptima fuente de inóculo (Colgan y Claridge, 2002). De este modo, los mamíferos son considerados grandes dispersadores de esporas, debido al mayor consumo y a su movilidad (Genard *et al.*, 1986; Johnson, 1994).

Sin embargo, existen otros organismos micófagos, principalmente pequeños escarabajos leiódidos (Coleoptera: Leiodidae) y las moscas de la trufa (Fig. 0.5), que pertenecen a ocho especies del género *Suillia* (Diptera: Helomyzidae) (Coutin, 1989; Pacioni *et al.*, 1991; Callot, 1999; Oliver *et al.*, 2002; García-Montero *et al.*, 2004).

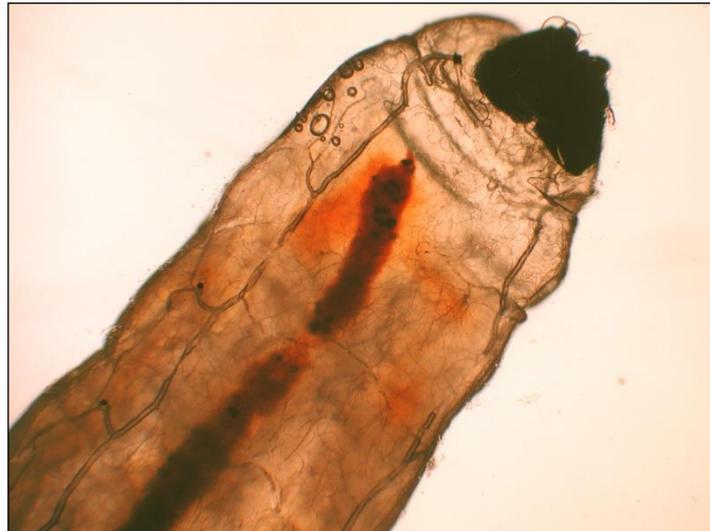


Figura 0.5.- Detalle de una larva de *Suillia* con esporas de trufa en su tracto digestivo.

Existen especies de dispersión mundial que afectan no solo a masas naturales de España, sino también son frecuentes en el resto del mundo, tanto en zonas forestales (Mougou *et al.*, 2008) como en plantaciones truferas. Es el caso de la enfermedad del oidio, producida por el hongo *Erysiphe alphitoides* Griffon & Maub. Afecta principalmente a especies del género *Quercus* aunque también puede desarrollarse sobre *Fagus sylvatica* L., *Castanea sativa* Miller. y otras especies no forestales (Melgarejo *et al.*, 2010).

En Australia el cultivo de trufa es relativamente reciente. El primer carpóforo recolectado fue en Tasmania en 1.999. Sin embargo su producción hoy en día es relevante. En 2014 se alcanzaron las 8 toneladas, con el 85% de la misma dedicada a exportación (Learmonth *et al.*, 2019), y actualmente ya supera las 10 toneladas (Oliach *et al.*, 2020) convirtiéndose así en el cuarto país productor de trufa negra, después de Francia, España e Italia. En los últimos años han aparecido una serie de plagas y enfermedades causando importantes pérdidas económicas, entre las que destacan *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* (Lamichhane y Varvaro, 2014), *Phytophthora cinnamomi* De Bary, *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Ph., *E. alphitoides*, *Discula quercina* (Cooke) Sacc. O el género *Diaporthe* Nitschke. La pudrición de los carpóforos es uno de los mayores problemas que está sufriendo la industria transformadora en Australia, habiendo alcanzado pérdidas del 39% de la producción en 2009 (Eslick, 2012). En cuanto a invertebrados asociados a plantaciones truferas en Australia destacan el escarabajo negro africano, *Heteronychus arator* (Fabricius, 1775), y aquellos capaces de alimentarse de trufas, como las babosas, dípteros de la familia *Sciaridae* o el escarabajo *Thalycrodes* sp. nr *australe*, de la familia Nitidulidae.

Los robles de Estados Unidos albergan más de 90 enfermedades bacterianas y fúngicas y más de 100 plagas, todas ellas capaces de nutrirse directamente de los árboles. Algunas de ellas tienen la capacidad de amenazar gravemente la salud, o incluso la supervivencia de la planta, y por tanto la productividad trufera (Hall *et al.*, 2009).

Hay enfermedades comunes a la mayoría de plantas simbiotes, como las debidas a oídios. *Microsphaera alni* (DC.) G. Winter y *Erysiphe trina* Harkn son capaces de desarrollarse sobre diferentes *Quercus*, y *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lev. sobre avellanos (Hall *et al.*, 2009).

El cultivo de avellano como planta simbiote de *T. melanosporum* en España se trata de una elección prácticamente anecdótica, aunque en el resto del mundo es frecuente. Por ello, son habituales las enfermedades derivadas del cultivo de esta especie, más sensible a agentes patógenos que la encina. Es el caso por ejemplo de la marchitez del avellano, enfermedad causada por el hongo *Anisogramma anómala* (Peck) E. Müller. Este ascomiceto afecta con más severidad al avellano común (*C. avellana*), aunque causa problemas menores en el avellano americano (*Corylus americana* Marshall) (Molnar *et al.*, 2010). También son comunes los chancros en avellano, como los causados por el grupo *Cytospora* Ehrenb. (Wiman *et al.*, 2019), las enfermedades bacterianas causadas por diferentes especies del género *Xanthomonas* Dawson (Pissetta *et al.*, 2016), o del género *Pseudomonas* Migula (Scortichini *et al.*, 2106) y virosis como la causada por el virus del mosaico del manzano (ApMV, Apple Mosaic Virus) (Grimová *et al.*, 2016).

El género *Phytophthora* de Bary causa graves daños en cultivos y plantas con relevancia económica. Es capaz de infectar a cerca de 5000 especies de plantas, no solo forestales, sino también agrícolas y ornamentales (Hardham y Blackman, 2018). En el sector de la truficultura todavía no se han encontrado daños ocasionados por este organismo. Sin embargo se debe de prestar atención principalmente a *Phytophthora ramorum* Werres *et al.*, causante de la muerte repentina del roble en los EEUU, e introducido en Europa (Grünwald *et al.*, 2019), y a *Phytophthora kernoviae* Brasier, especie detectada en Europa (Widmer *et al.*, 2018).

Diferentes invertebrados pueden causar daños en plantaciones de todo el mundo (Hall *et al.*, 2009), como son los barrenadores *Cossus cossus* (Linnaeus, 1758) y *Zeuzera pyrina* (Linnaeus, 1761), el escarabajo negro africano (*H. arator*), que se alimenta de las raíces, causando graves problemas en plantaciones jóvenes, los defoliadores *Tortrix viridiana* (Linnaeus, 1758) y *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758), y otros lepidópteros como, *Malacosoma neustria* (Linnaeus, 1758) o *Thaumtopoea processionea* (Denis y Schiffermüller, 1775).

Las micorrizas competidoras en el cultivo de trufa

Aunque las micorrizas son una estructura incuestionablemente beneficiosa para la planta, en ocasiones los hongos micorrícicos presentes en ambientes donde habitan las plantas trufas suponen un perjuicio para la actividad trufera. Es el caso de los hongos contaminantes de vivero y competidores de plantaciones.

En el caso de los viveros de producción de planta micorrizada, son asumibles ciertos niveles de contaminación por estos hongos micorrícicos (Fischer y Colinas, 1996; Palazón *et al.*, 1999a; Reyna *et al.*, 2000), niveles que son habitualmente sobrepasados si se dan las

condiciones adecuadas para su desarrollo y reproducción en los invernaderos. En el caso de *Sphaerosporella brunnea* (Alb. et Schwein.) Svrcek et Kubicka, su biología y comportamiento ha sido estudiado en profundidad en invernaderos de producción de planta micorrizada (Sánchez *et al.*, 2014a), permitiendo el control llevando a cabo un correcto manejo de las condiciones ambientales, así como una adecuada higiene en las instalaciones. Sin embargo, en el caso de otro de los principales hongos contaminantes en viveros de Francia e Italia (Amicucci *et al.*, 2001), *Pulvinula constellatio* (Berk. & Broome), el desconocimiento de la especie dificulta en gran medida su control, causando pérdidas económicas relevantes en los viveros de producción de planta micorrizada afectados por este hongo.

Ambas especies, *S. brunnea* y *P. constellatio*, son Pezizales de la familia Pyronemataceae, la familia más grande y heterogénea dentro de este orden. La mayoría de especies dentro de esta familia han sido consideradas saprofitas, aunque esto no se cumple en las especies más relacionadas con la truficultura, *S. brunnea* (García-Montero *et al.*, 1997), *Trichophaea woolhopeia* (Cooke & W. Phillips) Boud (Rubini *et al.*, 2010a) o *P. convexella* (Amicucci *et al.*, 2001). El hecho de tratarse de una familia tan extensa y heterogénea está dificultando su clasificación.

Los primeros años son cruciales para el éxito de una plantación trufera, ya que los propágulos infectivos de otros hongos nativos presentes en el suelo pueden conllevar el desplazamiento del hongo de la trufa de las raíces de las plantas micorrizadas, principalmente si estas plantas jóvenes presentan poca colonización por *T. melanosporum* (Iotti *et al.*, 2012). La presencia de micorrizas competidoras en plantas inoculadas con *T. melanosporum* es habitual no solamente en parcelas no productoras, sino también en aquellas con producción de *T. melanosporum* (Sánchez *et al.*, 2014b), asumiendo su presencia como una parte del cortejo fúngico del cultivo. La frecuencia en la aparición de estos hongos competidores está relacionada con la propia edad del árbol, así como con su naturaleza productiva (Águeda *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014b), aunque también influye la especie huésped, el ambiente circundante, o el manejo (de Miguel *et al.*, 2014).

3.- Manejo de plagas en plantaciones truferas

La truficultura es un cultivo con unas características propias que le aportan una serie de peculiaridades en relación a la gestión de plagas. En primer lugar la propia biología y ecología del hongo, que implica una visión global, que debe comprender no sólo el hongo, sino la planta simbiote y el ambiente que lo rodea. Pero también hay otros factores administrativos que es preciso tener en cuenta para gestionar una plantación trufera, ya que existe un marco legal en relación a dicho manejo y al comercio de planta forestal que marcarán las directrices a seguir para llevar a cabo el control de plagas y enfermedades.

3.1.- Biología de la trufa

La trufa es un hongo ascomiceto ectomicorrícico. La palabra micorriza define la relación de simbiosis entre un hongo (*mycos*) y las raíces (*rhizos*) de una planta. Se trata de una asociación mutualista en la que ambos miembros de la asociación se benefician y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes, influyendo tanto en la estructura como en la estabilidad de las comunidades vegetales (Miller *et al.*, 1994; Smith y Read, 2008). En esta simbiosis, la planta recibe del hongo principalmente nutrientes y agua, y el hongo obtiene hidratos de carbono, vitaminas, y la capacidad de reproducirse sexualmente (De la Varga *et al.*, 2016).

Estas características permiten a la planta mayor adaptación al medio, mayor competitividad con las plantas acompañantes no micorrizadas y mayor productividad (Miller *et al.*, 1994).

Esta relación de simbiosis implica que no se puede entender en la truficultura la planta y el hongo como dos sistemas diferentes. Se trata de un único ente a estudiar, y debe de ser comprendido como tal, ya que las actuaciones que realicemos sobre uno y otro y su entorno, pueden tener influencias en el equilibrio de esta asociación. El empleo de pesticidas puede influir en la simbiosis hongo-planta (Lacal, 2000; Palazón *et al.*, 2005). Además, el micelio de los macromicetos puede captar y bioacumular los metales pesados, apareciendo posteriormente en los carpóforos en concentraciones superiores a los del medio, hecho que principalmente sucede en especies saprofitas y micorrícicas (Alonso-Ponce *et al.*, 2004). Por este motivo, y ante la carencia de estudios de toxicidad de los diferentes productos fitosanitarios disponibles para el control de plagas, se tratará de evitar siempre que sea posible el tratamiento de patologías en plantaciones truferas con productos químicos.

Tuber melanosporum presenta una parte vegetativa y una parte sexual. La parte vegetativa, el micelio, está formada por un conjunto de hifas que colonizan el suelo en busca de agua y sales minerales, recursos necesarios para su desarrollo. La parte sexual culmina con la producción de cuerpos fructíferos a los que comúnmente se denomina trufas.

Este desarrollo del hongo en el suelo origina la formación de quemados, una zona alrededor de la planta huésped, desprovista de toda o de parte de vegetación debido a los efectos fitotóxicos de los metabolitos emitidos, hecho que también se produce en otras especies del género *Tuber*, como *T. aestivum* (Lanza *et al.*, 2004)

El ciclo biológico de la trufa (Fig. 0.6) negra comienza con la germinación de las esporas. Estas esporas haploides, tras la germinación, entran en contacto con las raíces finas de plantas huéspedes compatibles y comienza la formación de las micorrizas. De estas micorrizas emana un micelio que explorará el suelo, tomando nutrientes y colonizando nuevas raíces. Este proceso se repetirá durante varios años hasta comenzar la fase de reproducción sexual, en la que el árbol comienza a formar cuerpos fructíferos.

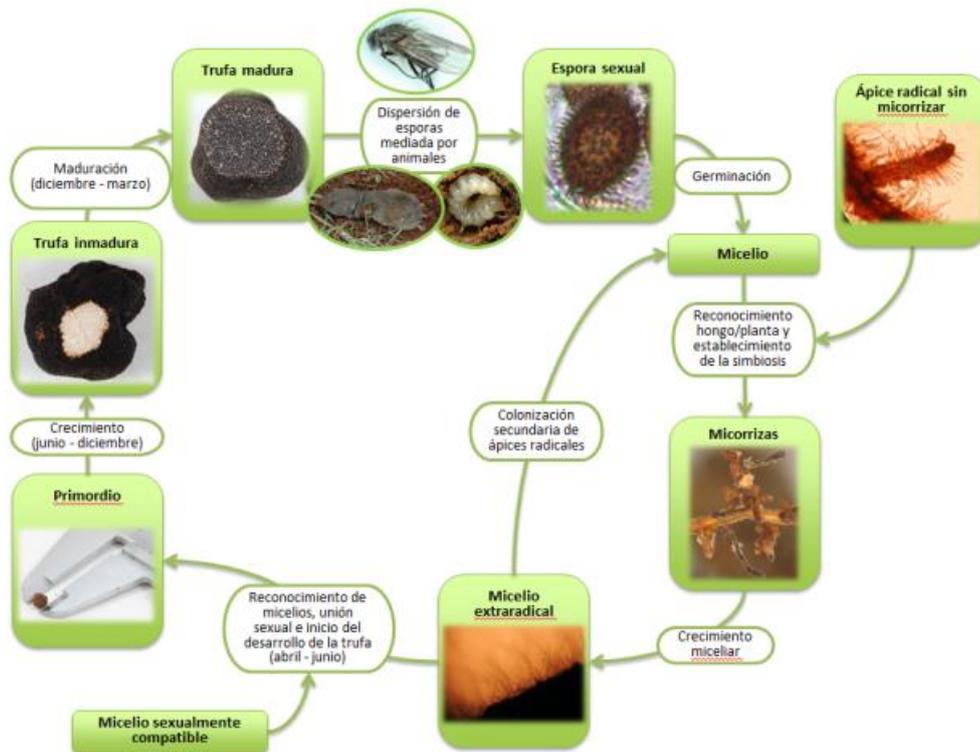


Figura 0.6.- Ciclo biológico de la trufa negra (*Tuber melanosporum*). Modificado de Oliach *et al.*, 2020.

En el transcurso de los últimos años se ha avanzado en el conocimiento del ciclo biológico de la trufa negra. El desarrollo de técnicas moleculares, así como la secuenciación completa de su genoma (Martin *et al.*, 2010) ha permitido avanzar principalmente en el conocimiento de la reproducción de *T. melanosporum*. La trufa es un hongo heterotálico (Paolocci *et al.*, 2006) y como tal necesita de al menos dos genotipos compatibles para la multiplicación. La reproducción sexual de este hongo se da por compatibilidad genética o tipo de “mating types” o “tipos de apareamiento” (Rubini *et al.*, 2011b).

Los trabajos llevados a cabo por Rubini *et al.* (2011b) muestran que el tejido parental de la gleba tiene solo un tipo de compatibilidad sexual, mientras que las esporas mantienen ambos. Además se ha observado en trabajos de vivero y campos que con el tiempo existe una tendencia de dominancia de un mating type sobre el otro (Rubini *et al.*, 2011c).

La formación de los primordios (primer estadio de fructificación) de trufa se produce entre finales de abril y junio. A partir del momento en que los primordios se han formado comienza un proceso de engrosamiento y posterior maduración de los carpóforos que se alargará hasta noviembre, cuando ya se comienzan a recolectar las primeras trufas maduras. En todo momento existe un nexo de unión entre la trufa y el árbol (Zeller *et al.*, 2008). Este hecho condicionará el manejo del suelo llevado a cabo en plantaciones trufieras, ya que es importante no realizar labores en el suelo con la intención de no romper ese vínculo. Este es

un hecho que se debe de tener en cuenta en caso de problemas fitopatológicos relacionados con topillos o larvas que se alimenten de las raíces que requieran un laboreo de la plantación para su control, ya que si la planta se encuentra ya en una fase productiva estos trabajos se limitarán a primavera (una vez finalizada la recolección de carpóforos y antes de que se formen los primordios), o a las zonas de fuera de los quemados.

Las especies que se alimentan de carpóforos de trufa, como es *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) (jabalí), *Meles meles* (Linnaeus, 1758) (tejón), los topillos *Microtus duodecimcostatus* (de Seyls-Longchamps, 1839) y *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), ácaros (Queralt *et al.*, 2014), así como otros artrópodos, aunque biológicamente son necesarios, en el ámbito económico llegan a producir daños inasumibles por el truficultor, alcanzando niveles de plaga. De este modo se presenta una dualidad: por una parte son elementos integrantes del ecosistema trufero indispensables para la dispersión del hongo (principalmente en áreas silvestres, en las que el hombre no interfiere con medidas culturales) y su reproducción sexual, y por otra disminuyen el valor comercial del producto.

3.2.- Ecología de la trufa

El entorno de una plantación trufera tiene efectos directos e indirectos sobre la vocación de la misma. El hongo *T. melanosporum* no es exigente en cuanto a parámetros climáticos y edáficos, aunque se deben cumplir unos mínimos para su fructificación, así como para el correcto desarrollo del pie simbionte para evitar el fracaso de plantaciones.

De acuerdo a Ricard (2003) la trufa es un hongo xero-termófilo que está adaptado a condiciones de elevadas temperaturas y sequías, con una marcada amplitud térmica, necesitando precipitaciones anuales entre 600 y 1500mm, temperaturas diarias medias en julio de entre 16,5 y 22°C y temperaturas medias en invierno entre 1 y 8°C, pudiendo oscilar en función de la latitud. En este sentido, la necesidad de la implantación de sistemas de riego en las plantaciones es un factor necesario en un territorio con precipitaciones cada vez más escasas (Čejka *et al.*, 2020), no solamente para la supervivencia y fructificación del hongo, sino también para el correcto desarrollo del pie simbionte.

En este sentido, la correcta elección de la planta es un factor a tener en cuenta. La especie vegetal a cultivar deberá adaptarse al entorno en el que vaya a realizarse el cultivo. La incorrecta elección de la especie simbionte puede conllevar problemas relacionados con heladas, estrés hídrico, elevada mortandad por falta de adaptación o la debilidad de la planta, haciéndola más susceptible a patógenos. La trufa negra es capaz de formar micorrizas con un gran número de especies vegetales (Ricard *et al.* 2003), aunque por sus requerimientos edáficos y climáticos compatibles con los de *T. melanosporum*, la encina es la especie más cultivada en España (Reyna *et al.*, 2012).

Las características edáficas son también un factor a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo un proyecto de plantación trufera. El hongo de la trufa requiere suelos calizos, con textura franca (Reyna, 2012), y contenido en arcilla inferior al 40% (Oliver, 2012), con pH entre 7,5 y 8,5 (Callot, 1999; Reyna, 2012). No requiere suelos ricos ni excesivamente profundos, aunque horizontes superficiales poco desarrollados con suelos poco profundos y con presencia de roca madre somera pueden provocar daños estructurales en el sistema radical, con una ausencia de raíz pivotante. Se ha observado en campo en estos casos una inestabilidad de los árboles frente a vientos intensos y nevadas, así como déficits en la nutrición.

3.3.- Manejo de plantaciones truferas

Previamente a la plantación es preciso llevar a cabo una correcta preparación del terreno. Las labores a realizar dependerán del tipo de suelo y del uso previo que se realizaba antes de la plantación. A grandes rasgos es aconsejable la plantación de algún cultivo extensivo (principalmente cereal) al menos dos años antes de comenzar la plantación trufera. Mediante esta actuación se disminuirá parte del inóculo fúngico presente en el suelo.

Es necesaria la realización de un subsolado siguiendo las curvas de nivel con la intención de romper la suela de labor que pueda haber en el terreno y favorecer la infiltración del agua.

Durante los primeros años de vida de la plantación, antes de la aparición de los quemados, es importante la eliminación de la competencia herbácea para el desarrollo de la planta huésped y del hongo. La práctica más común es el entrecavado manual o con laboreo superficial, mediante el cual se conseguirá también un aireamiento del terreno (Oliach *et al.*, 2020). Una vez comenzada la producción existen dos corrientes de manejo, una más conservadora en la que los quemados son respetados y no se labran, y otra más invasiva en la que se lleva a cabo un laboreo superficial en toda la plantación, incluso en los quemados (Chevalier y Pargney, 2014). Existen experiencias favorables en las dos opciones de trabajo del suelo, por lo que la elección de una u otra dependerá del criterio del truficultor, que en base a las características de su parcela y su experiencia deberá elegir entre una u otra.

Durante los primeros años de plantación es conveniente la aplicación de riegos de apoyo, principalmente si el verano se presenta seco, con la intención de asegurar el arraigo de la planta. Tanto la cantidad de agua como su distribución en el tiempo son imprescindibles para la correcta evolución de una plantación trufera durante la fase preproductiva (Bonet *et al.*, 2006; Olivera *et al.*, 2014). Los aportes hídricos son fundamentales para la correcta evolución de los carpóforos de *T. melanosporum*. Durante la fase productiva, los riegos se aplicarán desde principios de primavera hasta el otoño, cada tres semanas en caso de ser necesarios por existir un déficit hídrico. La cantidad de agua a aportar dependerá de las características de la plantación, así como de la meteorología, pero se recomiendan aportes hídricos que penetren al menos 30 cm en profundidad en el terreno (Oliach *et al.*, 2020). Un déficit hídrico en momentos puntuales puede desencadenar en una escasa producción de carpóforos. Sin

embargo, se trata de un hongo aerobio, por lo que el exceso de humedad es también perjudicial. Este complicado equilibrio determinará también los tratamientos biológicos a llevar a cabo en el control de plagas en truficultura, ya que algunos enemigos naturales empleados en agricultura biológica tradicionalmente necesitan mantener una humedad en el suelo elevada para su supervivencia y control de la especie plaga.

La poda en plantaciones truferas tiene como principales objetivos la eliminación de rebrotes, la entrada de luz en los quemados y el control del crecimiento en altura de los árboles, sobre todo de aquellas especies con tendencia al excesivo desarrollo de la parte aérea. Durante los primeros años de plantación se deberán realizar podas ligeras de formación, con el fin de conducir a las plantas hacia portes arbóreos que permitan la insolación y aireación del suelo en la zona del quemado. Realizando podas de este tipo se facilitará también la puesta en riego de la parcela, así como la recolección. La poda siempre deberá ser frecuente y poco intensa, desaconsejándose la eliminación de más del 30% de la masa foliar (Oliach *et al.*, 2020).

Desde hace varios años, se ha extendido entre el sector trufero español una práctica agronómica conocida como “pozos”, “nidos” o “aportes”. Consiste en incorporar diferentes tipos de sustratos en zonas puntuales alrededor de los árboles de las plantaciones, compuestos por materia vegetal compostada y otros elementos inertes que modifican las propiedades físico-químicas de esa zona. En algunos casos estos aportes comienzan a realizarse en edades muy tempranas, añadiendo en la mayoría de las ocasiones inóculo esporal de la especie de trufa deseada. La realización de pozos permite disponer de un volumen de suelo pequeño (más o menos dos litros) y perfectamente localizado con mayor probabilidad que en el resto de puntos de una plantación de que en él tenga lugar la unión de talos (sexualidad), el inicio de la formación de trufas y la maduración de las mismas (Murat *et al.*, 2016). Esta práctica tan extendida en el sector puede tener influencias en la aparición de plagas y enfermedades, favoreciendo en algunos casos la aparición de agentes nocivos, como es el caso de los gusanos blancos o provocando una menor afección de insectos micófagos, como es el caso de *L. cinnamomeus* (capítulo 4) (García-Barreda *et al.*, 2020).

La propia juventud del cultivo de trufa conlleva un desconocimiento del manejo de las plantaciones. La innovación en cuanto a su gestión es continua. Sin embargo, la prudencia y el temor ante el fracaso de las nuevas técnicas, que pueden poner en riesgo la producción futura de las plantaciones, limita las investigaciones llevadas a cabo en el sector.

4.- Legislación aplicada a la sanidad en truficultura

4.1.- Normativa relacionada con el comercio de planta micorrizada para el establecimiento de plantaciones truferas

El conocimiento de las técnicas de micorrización a gran escala por parte del sector viverista ha hecho posible una gran expansión de los cultivos dedicados a la producción de trufa negra. Sin embargo en la actualidad existe un gran problema derivado del posible fraude en el comercio de las plantas micorrizadas, al no existir sistemas de certificación y control sobre el estado y calidad micorrícica que debe presentar toda planta que se comercialice, y por tanto no existiendo una garantía de calidad suficiente para el consumidor final.

La única normativa a la que acogerse es el Real Decreto 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción, parcialmente modificado por el Real Decreto 1220/2011, de 5 de septiembre, para la planta destinada a actuaciones selvícolas en general, en el que se pretende que los materiales forestales de reproducción de las especies e híbridos que se usen en silvicultura sean fenotípica y genéticamente de alta calidad, así como adecuados a las condiciones del medio en el que se empleen.

Además de requisitos relacionados con las semillas, se marcan también criterios de calidad para la planta a comercializar, como son la edad máxima, la altura mínima y máxima, o el diámetro del cuello de la raíz.

Paralelamente, se exige que por lo menos 95 de cada 100 plantas de cada lote sea de calidad cabal y comercial, definiendo que no se considerará de este modo las plantas que presentes alguno de los siguientes defectos (Fig. 0.7):

- a) Heridas distintas de las causadas por la poda o heridas debidas a los daños de arranque.
- b) Ausencia de yemas susceptibles de producir un brote apical.
- c) Tallos múltiples.
- d) Sistema radicular deformado.
- e) Signos de desecación, recalentamiento, enmohecimiento, podredumbre o daños causados por organismos nocivos.
- f) Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical.

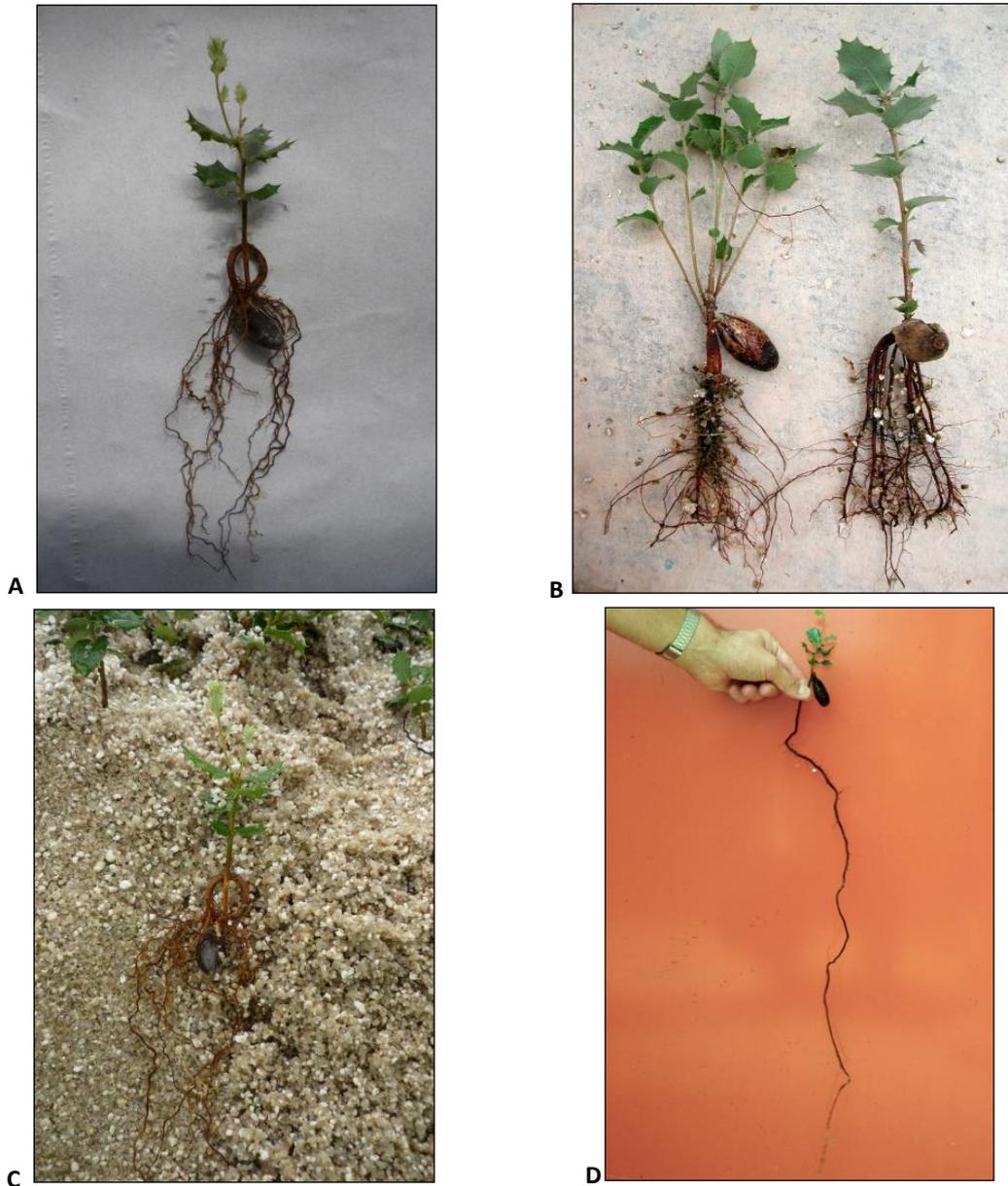


Figura 0.7.- Diferentes malformaciones en planta de vivero que pueden comprometer la viabilidad de los lotes. A: Sistema radicular deformado. B: Tallos múltiples y ausencia de raíz pivotante. C: Sistema radicular deformado. D: Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical.

Por este motivo, cualquier plaga capaz de causar alguna de estas malformaciones puede provocar el rechazo del lote afectado, con el consiguiente perjuicio económico para el vivero afectado.

Sin embargo, no solamente se deben de cumplir unos mínimos en cuanto a calidad de planta. De acuerdo a este Real Decreto, en el CAPÍTULO VI (Otras disposiciones) consta el Artículo 17. (Condiciones fitosanitarias de los materiales forestales de reproducción). En él se expone que los materiales forestales de reproducción cumplirán, en su caso, las condiciones fitosanitarias pertinentes establecidas en el Real Decreto 2071/1993, de 26 de noviembre, relativo a las medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y

de la Comunidad Económica Europea (hoy, Unión Europea) de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

4.2.- Normativa relacionada con el control de plagas

La Ley 43/2002, de 20 de noviembre, de Sanidad Vegetal contempla un marco legal que comprende los aspectos relativos a los medios utilizados en la lucha contra las plagas, en especial los productos fitosanitarios, para garantizar que en su manipulación y aplicación no existan efectos perjudiciales para la salud del consumidor o del aplicador, para los animales o para el medio ambiente. El objeto de la Ley es establecer un marco uniforme que dé cobertura legal al conjunto de normas actualmente vigentes en materia de sanidad vegetal.

De acuerdo a esta normativa se comprende como “plaga” a *todo organismo nocivo de cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para los vegetales o los productos vegetales*. De este modo se entendería el concepto de “control de una plaga” como la aplicación de medidas fitosanitarias encaminadas a evitar la propagación de la misma, reducir su población o sus efectos, o a conseguir su erradicación.

Los medios de defensa fitosanitaria deberán ser utilizados adecuadamente, teniendo en cuenta las buenas practicas fitosanitarias, de modo que la utilización de productos fitosanitarios se limite al mínimo necesario para el control de las plagas.

Se hace hincapié en toda la normativa relacionada con el uso de fitosanitarios al empleo racional de los mismos. La Directiva 2009/128/EC, así como su transposición al ordenamiento nacional a partir de los Reales Decretos 1702/2011 de inspecciones periódicas de los equipos de aplicación de productos fitosanitarios, y el Real Decreto 1311/2012 por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios pretenden la consecución del uso sostenible de los mismos, reduciendo sus riesgos y efectos para la salud humana y el medioambiente, y la promoción de la Gestión Integrada de Plagas y los métodos y técnicas alternativas, como los medios de control no químicos.

El objetivo final de estas normativas es alcanzar una agricultura sostenible, capaz de abastecer las necesidades alimentarias del presente sin poner en peligro el abastecimiento de alimentos de generaciones futuras. Su aplicación, pretende sustituir el modelo de agricultura productivista poco preocupada por las exigencias de protección del medio ambiente.

En caso de existir la necesidad de emplear productos fitosanitarios, éstos deberán estar autorizados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación e inscritos en el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario (<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>).

Sin embargo, en el caso de la truficultura, se trabaja con un cultivo forestal, ya sea encina, quejigo, roble o avellano. Por este motivo, existen muy pocos productos autorizados por el

Ministerio. En caso de que se presente un peligro imprevisible que no pueda controlarse por otros medios, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación podrá autorizar la comercialización de productos fitosanitarios para una utilización controlada y limitada.

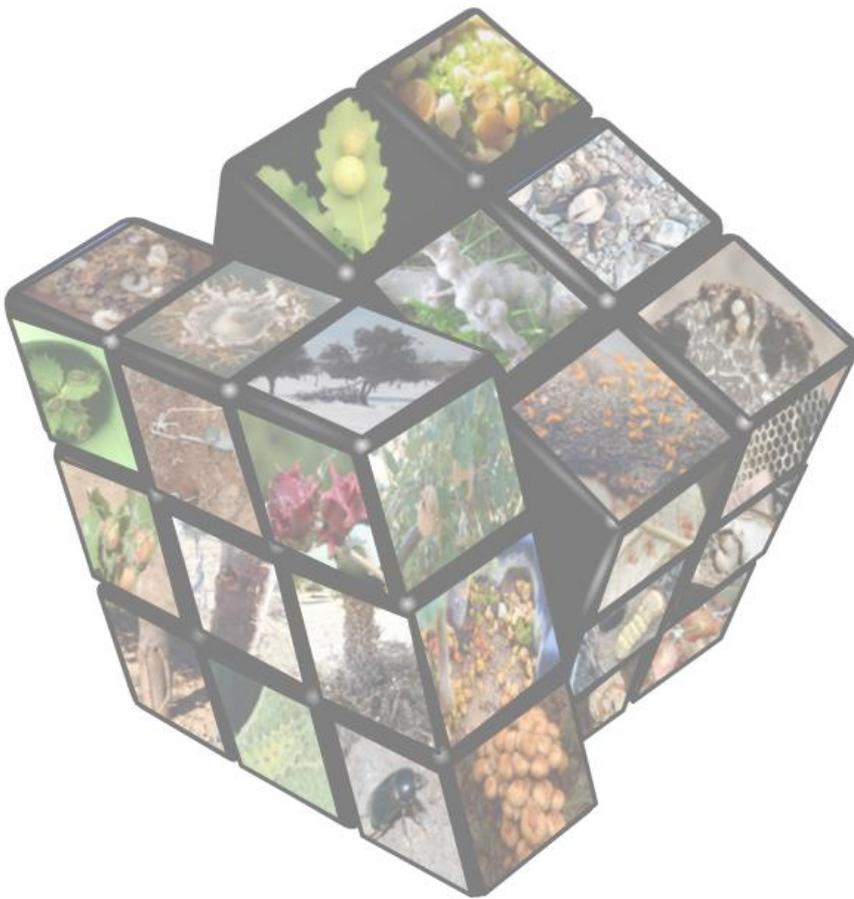
Un sistema para llevar a la práctica los objetivos de una agricultura sostenible es la Gestión Agraria Integrada o Producción Integrada, en la que la toma de decisiones en la protección de los cultivos frente a plagas, enfermedades y malas hierbas se debe basar en las técnicas de Manejo Integrado. El Manejo Integrado, también llamado Protección Integrada, Control Integrado o Lucha Integrada, es el método de control más avanzado que existe en la actualidad. Cuando su objetivo es el control de los daños provocados por los artrópodos en los cultivos se habla de Manejo Integrado de Plagas. Consiste en la integración de las técnicas de lucha química y lucha biológica, así como de todos los posibles medios y técnicas adecuadas, haciendo especial incidencia en la acción limitante del propio medio ambiente. Este sistema completa la racionalización del control químico en las técnicas de lucha dirigida con métodos naturales que satisfagan a la vez exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas.

El manejo integrado de plagas implica, por tanto, la consideración simultánea de tres niveles del ecosistema agrícola:

- El propio cultivo
- Las plagas asociadas a ese cultivo
- Los organismos antagonistas de las plagas, es decir, sus enemigos naturales, formados principalmente por lo que se llama la fauna útil o fauna auxiliar (Pérez-Moreno, 1997).

Las principales técnicas a aplicar en este sistema de control son determinadas prácticas culturales, la lucha biológica y los métodos biotécnicos (Carnero *et al.*, 1996). En el caso de la truficultura, y debido a sus peculiaridades (Reyna, 2012), se debería recurrir en la medida de lo posible a estas técnicas respetuosas con el medio ambiente con la intención, por un lado, de no deteriorar la visión de mercado de un producto ecológico cada vez más valorada por el consumidor final, y por otra, no dañar el estrecho vínculo planta-hongo.

OBJETIVOS GENERALES



OBJETIVOS GENERALES

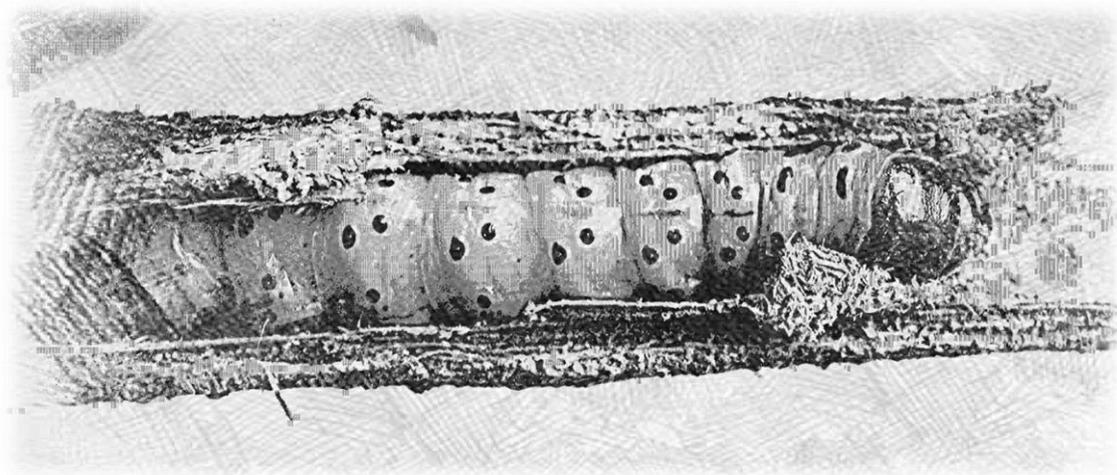
En la presente tesis doctoral se ha realizado un exhaustivo estudio de todos los agentes nocivos detectados en plantaciones truferas, con la intención de conocer los presentes y futuros riesgos de estos sistemas agroforestales.

Posteriormente se han desarrollado en el resto de capítulos aquéllos que se han considerado de mayor relevancia, ya sea por su nueva detección en los viveros de producción de planta micorrizada (*Pulvinula constellatio* (Berk. & Broome) Boud.), por el desconocimiento de su agente causal (tumorações en encinas), o por el gran impacto económico que supone en la actualidad (*Leiodes cinnamomeus* Panzer). Por ello se plantean dos objetivos generales:

- 1.- La identificación de los agentes nocivos con posible incidencia en truficultura (capítulo 1).
- 2.- La profundización en aquéllos que se consideran más relevantes en cada una de las fases del cultivo: fase de vivero (capítulo 2), fase de mantenimiento de plantaciones (capítulo 3) y fase de producción (capítulo 4).

Capítulo 1

Situación actual de las plagas y enfermedades asociadas a plantaciones truferas



INTRODUCCIÓN

Hasta el presente es escasa la información existente sobre plagas y enfermedades asociadas al cultivo de la trufa. Hay un gran número de artículos y libros generalistas sobre plagas de encinas, robles, hongos... pero en muy pocos se profundiza en los daños asociados al cultivo de la trufa (Barriuso *et al.*, 2012; Martín-Santafé *et al.*, 2014a; Pérez-Fortea y Martín-Santafé, 2018). Posiblemente este hecho sea debido a que los problemas fitopatológicos en el cultivo de trufa son relativamente recientes, al igual que el propio cultivo.

Comenzar una plantación trufera correctamente es imprescindible para alcanzar el éxito de la misma. La existencia de hongos contaminantes en fase de vivero es frecuente. De hecho, todos los métodos de evaluación de planta micorrizada aceptan un número de estos hongos en las raíces de los plantones (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014). Sin embargo, hoy en día se desconoce la evolución de estos competidores en campo, existiendo carencias en el conocimiento relacionado con su peligrosidad y competitividad una vez la planta está establecida en la plantación. Los trabajos realizados sobre *Sphaerospora brunnea* (Alb. & Schwein.) Svrček & Kubička, la especie más frecuente en viveros españoles de producción de planta micorrizada (Sánchez *et al.*, 2014a) parecen indicar que se trata de una especie pionera en la fase de invernadero, aunque poco agresiva en la fase de campo (Chevalier y Poitou, 1990). Sin embargo, se desconoce la persistencia en plantaciones, así como la influencia en el éxito de la plantación de otros hongos frecuentes en análisis de plantones micorrizados como *Scleroderma* Pers., *Trichophaea woolhopeia* (Cooke & W. Phillips) Boud. o *Tuber borchii* Vittad.

Las características intrínsecas de la truficultura pueden favorecer también el desarrollo de agentes nocivos. En las plantaciones truferas predominan marcos reales de plantación de 6x6m. Cuando los árboles son adultos la proximidad de las copas (Fig. 1.1) favorece la dispersión de parásitos, así como el movimiento de vectores de enfermedades a través de las corrientes de aire (Moran *et al.*, 1982).



Figura 1.1.- Plantación adulta en la que se han realizado escasos trabajos de poda, lo que favorece el contacto entre las copas.

Del mismo modo, la cercanía de las raíces en los árboles en plantaciones establecidas pueden favorecer la propagación patógenos (Kile, 1991), así como de hongos contaminantes competidores ente las plantas a través de las hifas y rizomorfos que emanan de sus micorrizas (Cairney, 1991; Bowen, 1994). Esta competencia de *Tuber melanosporum* Vittad. con otros hongos micorrícicos más agresivos es uno de los problemas en la truficultura actual, habiéndose dado casos en los que la trufa ha sido desplazada por otras especies como *Scleroderma* sp. (Hall y Wang, 1998), por *Tuber brumale* Vittad. (Chevalier *et al.*, 1982; Etayo y de Miguel, 1998) o *Hebeloma* sp. (Fr.) P. Kumm (Granetti y Angelini, 1992). Se han detectado problemas similares en el cultivo de *Tuber magnatum* Picco y *Tuber uncinatum* Chatin (Capecci *et al.*, 1999).

Trabajos como el laboreo del suelo pueden contribuir a la dispersión dentro de la plantación de organismos patógenos, así como de otros hongos competidores no deseados (Trapero y Blanco, 2014). La mayor parte de las plantaciones se ha concentrado en antiguos campos de cultivo, aprovechando las llanuras y la proximidad a los municipios, y reduciendo la presencia de los hongos competidores y patógenos presentes en zonas forestales. Esto ha provocado una densificación del cultivo y la intensificación del mismo (Fig. 1.2). Este hecho, unido al empleo casi exclusivo de la encina como simbionte en nuestro país puede haber favorecido también al aumento de poblaciones de estos insectos vectores, y de los agentes nocivos.



Figura 1.2.- Grandes extensiones que presentan un monocultivo pueden favorecer el desarrollo de plagas y enfermedades.

Una de las prácticas culturales más importantes en el presente es la implantación de sistemas de riego en plantaciones truferas. Gracias al riego localizado en microaspersión, se está realizando un aprovechamiento más regular, consiguiendo producciones estables en años de déficit hídrico. Este hecho tan beneficioso para la economía del truficultor está siendo, sin duda, perjudicial si nos referimos a la proliferación de plagas relacionadas con los cuerpos fructíferos. Al no haber años de escasa producción, las poblaciones de insectos asociadas a los carpóforos no disminuyen, modificando la dinámica poblacional natural de los insectos. Este problema se está viendo en especies como *Leiodes cinnamomeus* Panzer o moscas de la familia *Helomyzidae*.

Por tanto, la tecnificación, así como la intensificación y la densificación de este cultivo están favoreciendo el desarrollo de plagas y enfermedades que en condiciones naturales no existían como tales.

El empleo de insecticidas u otros pesticidas como herbicidas en truficultura debería de ser limitado a casos de daños económicos inasumibles, ya que los casos estudiados muestran en efecto inhibitorio de diferentes insecticidas sobre el crecimiento de micelio incluso a bajas concentraciones (Rai y Varma, 2011), contradiciendo los estudios realizados por Trappe *et al.* (1984), en las que indicaba que la influencia de pesticidas podría llegar a influir en el desarrollo del hongo en determinadas concentraciones. Unido a este argumento, existen pocos productos fitosanitarios que puedan ser empleados actualmente en truficultura debido a la estricta regulación de estas sustancias por parte de la administración, que tiende siempre a un uso racional y sostenible de químicos. Por este motivo, en ocasiones el truficultor se alarma ante la presencia de agentes nocivos en sus plantaciones. La truficultura es un aprovechamiento a largo plazo, en el cual la amortización del dinero invertido es incierta debido a la inseguridad que rodea el correcto desenlace de la plantación establecida. Hay fincas que nunca llegan a producir carpóforos, mientras que otras pueden alcanzar los 200 kg/ha (Letizi *et al.*, 1999). La entrada de plagas o enfermedades capaces de comprometer la

muerte de árboles productores es un hecho que causa una gran preocupación, ya que el valor de un árbol productor es muy elevado.

Además, la gestión de plagas en truficultura requiere de un gran conocimiento por parte del truficultor de la biología y ecología del hongo y de la planta, ya que cualquier manejo equivocado de las condiciones del medio puede tener consecuencias perjudiciales para la simbiosis. Hay que tener en cuenta que un gran número de truficultores no ha tenido relación previa con el sector agrícola, por lo que desconocen determinados manejos habituales en este sector, aplicando metodologías de gestión en sus plantaciones basados en experiencias de otras personas, foros de internet, o por su propia intuición, muchas veces extrapolando equivocadamente los resultados obtenidos en fincas que se hallan bajo otras condiciones diferentes.

Los carpóforos también pueden ser afectados por plagas (Figura 1.3), enfermedades y daños ocasionados tanto por animales silvestres como por factores climáticos adversos. La devaluación de la trufa a causa de estos agentes, así como las pudriciones derivadas de ellos, puede ocasionar graves pérdidas tanto al recolector como a las empresas comercializadoras y transformadoras. La pudrición de trufa en Australia ha llegado a originar pérdidas de hasta el 50% de la cosecha en algunas fincas (Eslick, 2012), habiéndose atribuido este hecho a un exceso de humedad en suelo y a la carencia de laboreo superficial. La realización de este laboreo superficial permitiría una aireación del suelo y una mayor profundidad en la formación de trufas, quedando menos expuestas a agentes bióticos y abióticos que pudieran causar daños.



Figura 1.3.- Varios adultos del escarabajo de la trufa (*Leiodes cinnamomeus*) alrededor de dos carpóforos de *Tuber melanosporum* recién descubiertos.

Hay que tener en cuenta que la truficultura es un cultivo a largo plazo. En todo el proceso productivo se pueden encontrar varias fases: producción de planta micorrizada en invernadero, mantenimiento de plantaciones y producción de carpóforos. En este trabajo se pretende mostrar las principales plagas y enfermedades asociadas a cada una de estas fases.

La carencia de estudios previos realizados sobre plagas y enfermedades asociados a zonas de producción silvestre, así como la escasa información sobre posibles agentes patógenos en plantaciones exige comenzar este trabajo con un capítulo en el cual se recopilen los problemas fitopatológicos encontrados en España, con la intención de centrar posteriormente los esfuerzos en aquellas más relevantes en cada fase del cultivo. En el presente capítulo se muestra un exhaustivo estudio de las plagas y enfermedades detectadas en las plantaciones truferas españolas.

OBJETIVOS

Este capítulo presenta un **objetivo principal**,

- La descripción de las plagas y enfermedades presentes en plantaciones truferas españolas.

Para la obtención de un **objetivo secundario**:

- La selección de aquellas más relevantes a desarrollar y estudiar en el resto de capítulos, correspondientes a las tres fases del cultivo: vivero, mantenimiento de plantaciones y producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Área de trabajo y metodología

La mayor parte de la información generada procede de datos obtenidos en las plantaciones y las zonas forestales de producción de trufa en España, principalmente de la región de Aragón. Se trata de una región que presenta unas condiciones ecológicas óptimas para el desarrollo de la trufa negra, hecho que se refleja en el gran número de plantaciones presentes, y en los elevados rendimientos que se obtienen de esta actividad.

Sin embargo, los estudios se amplían al resto de España a través de las consultas recibidas por el sector en los últimos 10 años en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), en el Centro de Innovación en Bioeconomía Rural de Teruel (CIBR), en el Laboratorio de Sanidad del Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad del Gobierno de Aragón, y en el Centro de Investigación y Experimentación en Truficultura de la Diputación de Huesca (CIET). Estas consultas se han recibido principalmente de Aragón, Castilla la Mancha, Castilla León, Cataluña, Comunidad Valenciana, La Rioja, Andalucía, Murcia y País Vasco.

Una vez realizada la consulta, se procedió a la visita de parcelas en las que fue posible para la identificación *in situ* del agente causal de la patología, o a la identificación a través de documentación gráfica cuando no pudo realizarse la salida a campo. En caso de duda en este segundo supuesto se solicitó el envío de material para su identificación en laboratorio. En todos los casos se realizó un seguimiento de evolución de los síntomas.

Para la identificación del agente nocivo se emplearon libros generalistas de identificación de plagas y diagnóstico de enfermedades descritos en los siguientes apartados. En los casos en los que un hongo estuvo implicado en el desarrollo de la enfermedad se realizaron aislamientos y cultivo *in vitro* del patógeno, y se realizaron análisis moleculares en los casos en los que la identificación morfológica no dio resultados concluyentes.

En base a estos resultados se desarrolló la Tabla 1.1, en la que se muestran todos los agentes nocivos identificados. Se describen en ella la fase de cultivo, la zona afectada, el agente nocivo, la descripción, incidencia y el nivel de daño cuando hay un ataque y las consecuencias cuando ocurre el problema:

- a) Fase de cultivo. Clasificación en función a la fase en la que se producen los daños, diferenciando entre:
 - a. Invernadero. Daños desde que se hace acopio de la bellota hasta que la planta sale del vivero de producción de planta micorrizada.
 - b. Plantaciones. Plagas que afectan al pie simbiote.
 - c. Carpóforos. Agentes nocivos capaces de afectar a los cuerpos fructíferos.

- b) Zona afectada. Descripción del lugar donde se producen los daños.
 - a. Invernadero
 - i. Parte aérea
 - ii. Parte radical
 - iii. Bellotas
 - b. Plantaciones
 - i. Parte aérea
 - ii. Parte radical
 - c. Carpóforos
- c) Agente nocivo. Nombre del agente causal de la patología.
- d) Descripción. Breve descripción de los daños o de las características más destacadas de la patología para su rápida identificación.
- e) Incidencia. Clasificación cualitativa en tres grupos (alta-media-baja) en función de la frecuencia de aparición de la patología.
 - a. Alta: Patología habitual
 - b. Media: Patología frecuente, aunque no habitual
 - c. Baja: Patología anecdótica o poco frecuente
- f) Nivel de daño cuando hay un ataque. Clasificación cualitativa en tres grupos (alto-medio-bajo) en función de los daños que origina el agente causal cuando aparece, independientemente de su incidencia.
 - a. Alto: Produce daños intensos, e incluso la muerte del pie simbiote. En el caso de carpóforos causa perjuicios económicos insasumibles.
 - b. Medio: Los daños no llegan a causar la muerte del pie simbiote o de devaluación completa del carpóforo, aunque sí que pueden originar daños notables.
 - c. Bajo: No causa daños relevantes.
- g) Consecuencias cuando ocurre el problema. Descripción de los daños que se originan cuando se produce la patología.

2.- Toma de datos e identificación de agentes nocivos

La metodología de muestreo se ha llevado a cabo siguiendo los procedimientos estandarizados. Las técnicas empleadas para la identificación de cada patógeno dependieron de la naturaleza del mismo.

2.1.- Captura e identificación de insectos

En los casos en los que los daños eran causados por insectos, se realizaron prospecciones visuales del material vegetal o fúngico afectado. En los supuestos en los que de este modo no pudo ser localizado el agente causal, se colocaron las trampas más comúnmente empleadas en trabajos de entomología. Los trampeos han incluido trampas Malaise (Townes, 1972), mangas

entomológicas, mosqueros (Fig. 1.4), trampas cromáticas adhesivas, o trampas realizadas con botes de polipropileno.

Después de llevar a cabo los muestreos, las muestras fueron llevadas al laboratorio, donde fueron procesadas e identificadas de acuerdo a la bibliografía.



Figura 1.4.- Procedimiento para la captura de mosca de la trufa en plantaciones truferas. A: Trampa empleada. B: Colocación del aerosol pegajoso para en el interior de la tapa. C: Estado de la trampa una semana después de su colocación. D: Detalle de las moscas capturadas.

Para la identificación de los agentes nocivos se emplearon libros generales como los trabajos llevados a cabo por De Liñán (1998), Fraval (1998), Agrios (1998), Riley *et al.*, (2002), ACTA (2016) y la base de datos del programa integrado de plagas de la Universidad de California (<http://www.ipm.ucdavis.edu/>).

2.2.- Identificación de hongos micorrícicos competidores

La aparición de cuerpos fructíferos en los contenedores de las plantas en viveros, la localización de carpóforos diferentes a *T. melanosporum* en las fincas y la ausencia de producción en plantaciones maduras derivaron en determinados casos en el análisis de las micorrizas de las plantas afectadas con la intención de comprobar, por una parte la identidad del hongo, y por otra, la permanencia de *T. melanosporum* en las raíces.

2.2.1.- Identificación morfológica

En el caso de la determinación de hongos micorrícicos competidores se recurrió en primer lugar a técnicas microscópicas. Las muestras tomadas en campo se lavaron cuidadosamente sobre un tamiz de 0,5mm de luz para evitar la pérdida de ápices radicales. En algunos casos fue necesario limpiar las micorrizas al microscopio estereoscópico con ayuda de pinzas y/o el empleo de agua con Tween® 80 al 0,2% e incluso de un baño de ultrasonidos para eliminar las partículas de suelo adheridas.

Una vez limpias las raíces, se colocaron en placas de Petri con agua para observarlas al microscopio estereoscópico, donde se realizó una primera clasificación por morfotipos (Agerer, 1991). Para la identificación de cada uno de los morfotipos se emplearon los trabajos de: Agerer (1987-2011), De Miguel *et al.* (2001), Etayo (2001), De Román (2003), De Miguel y Sáez (2005), Agerer (2006), Reyna y De Miguel (2007), Clavería (2007) y Agerer y Rambold (2011). La clasificación taxonómica de los tipos encontrados está basada en CABI Biosciences (2011).

2.2.2.- Identificación molecular

En algunas ocasiones la identificación morfológica de las ectomicorrizas no fue suficiente, bien porque el hongo no estaba descrito en la bibliografía o bien porque la micorriza, por su estado, no presentaba suficientes caracteres morfológicos para su identificación, siendo imprescindible recurrir a la biología molecular como herramienta de apoyo.

Algunos de estos casos fueron:

- Se encontraban deterioradas, por su edad, degradación orgánica o deshidratación.
- No presentaban caracteres diferenciales por encontrarse en formación.
- Se apreciaban caracteres diferenciales, pero no los suficientes como para incluirlas en ningún grupo taxonómico descrito en las fuentes consultadas.

Los análisis consistieron en secuenciar la región ITS del hongo que formaba la micorriza y comparar las secuencias obtenidas con las más parecidas de entre las presentes en las bases de datos GenBank (Benson *et al.*, 2009) y UNITE (Abarenkov *et al.*, 2010), empleando la herramienta BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

Para la extracción del ADN, así como para su amplificación se siguió el método llevado a cabo en trabajos similares (Paolocci *et al.*, 1999; Mabru *et al.*, 2001; Baciarelli-Falini *et al.*, 2006).

Las micorrizas fueron lavadas en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos para eliminar los restos adheridos. Posteriormente se introdujeron dos ejemplares en un tubo

epENDORF® que contenía 400µL del tampón de lisis AP1 del DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Se trituró con un micropistilo estéril, se mantuvo 24 horas macerando en el tampón (Gebhardt *et al.*, 2007) y se continuó el protocolo de extracción siguiendo los pasos indicados por el fabricante. El resultado final del proceso es una suspensión de 50µL del ADN de cada muestra, las cuales se conservaron a -20°C hasta su uso.

La amplificación del ADN extraído se realizó con el termociclador GeneAmp® PCR System 9700, de Applied Biosystems. Las concentraciones de los reactivos en la reacción de PCR, así como el programa de amplificación para los primers ITS1-ITS4 sintetizados por la empresa Invitrogen (Barcelona), fueron los descritos por Torrecilla y Catalán (2002).

La presencia de productos de PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 35 minutos a 100V y teñido con 0,8µL de solución Midori Green DNA stain (Nippon Genetics Europe GmbH). Los productos en los que se observó una sola banda se purificaron con ExoSAP IT (GE Healthcare, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de amplificación fueron secuenciados por el Servicio de Biología Molecular del Parque Tecnológico Aula Dei (Fundación PCTAD <http://www.pctauladei.com/>). Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa Chromas Lite 2.6 (Technelysium Pty Ltd. <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), observando las zonas de mayor fiabilidad debido a la longitud y delimitación de los picos generados por el cromatograma.

La identificación de las secuencias obtenidas se realizó a través de la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), buscando las secuencias con mayor homología.

2.4.-Identificación y aislamiento de hongos patógenos

La identificación de hongos patógenos se realizó generalmente *de visu* analizando la sintomatología que presentaban las plantas afectadas, y de acuerdo a la bibliografía. En los casos en los que fue necesaria una comprobación de la identidad del hongo, se realizó el cultivo *in vitro* para su posterior identificación (Fig. 1.5).

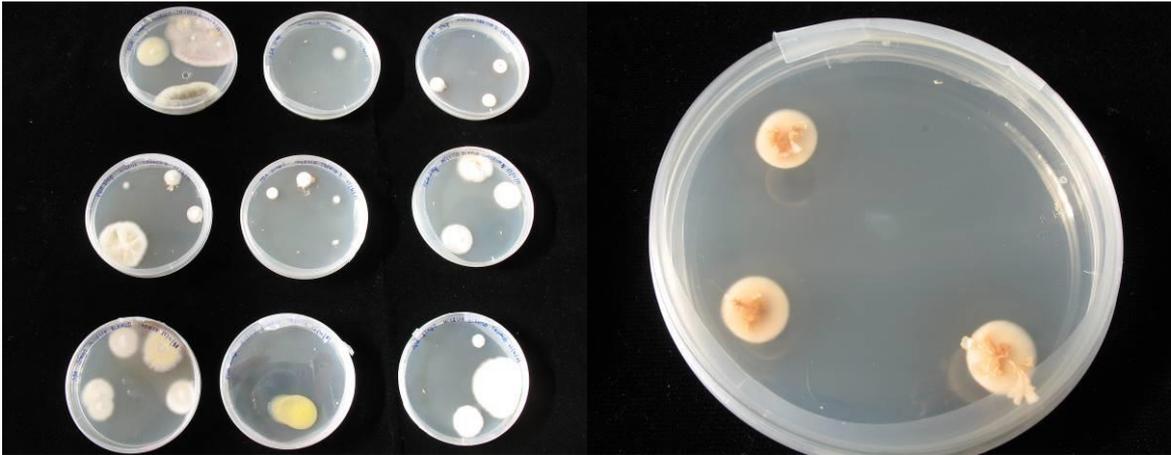


Figura 1.5.- Batería de aislados de plantas sintomáticas (Izquierda). Detalle de placa con aislados de *Armillaria mellea* (Derecha).

En estos casos, se tomaron muestras de campo de plantas sintomáticas y se llevaron al laboratorio. Se retiró la superficie de los tallos, troncos, u otro material vegetal afectado con la intención de retirar los posibles hongos y bacterias saprofitas presentes en la muestra, y el material restante se llevó a la cabina de flujo laminar (Telstar Modelo BH10). Posteriormente, se cortaron segmentos (aproximadamente 3 mm) de los tejidos que aparentaban presentar daños y se sembraron cinco segmentos en placas Petri con medio de cultivo PDA (Patata-dextrosa-Agar, Difco™ pH 5,6). Los cultivos in vitro se incubaron (Incubadora Memmert, IPP500) a 24°C. Se realizaron observaciones microscópicas diarias del desarrollo de las hifas y del micelio.

Los hongos se identificaron en un primer paso por sus características morfológicas empleando claves de identificación de deuteromicetos como Barnett y Hunter (1999) o libros generales como Alexopoulos y Mims (1985).

Los hongos que crecieron a partir de estos cultivos se fueron purificando en PDA a medida que iban surgiendo. Cuando estas colonias se encontraban contaminadas con bacterias se hizo un repicado previo a PDA con estreptomicina 30ppm para eliminarlas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio se muestran en las tres fases principales del cultivo de la trufa: vivero, mantenimiento de la plantación y carpóforos. Se han considerado en el trabajo los hongos micorrícicos competidores que, si bien no son un problema fitosanitario, conllevan pérdidas económicas importantes.

Todos los agentes nocivos se han representado en la Tabla 1.1. En esta tabla se exponen también los daños que éstos producen y las consecuencias que tienen sobre el cultivo. Existen plagas (comprendiendo como término “plaga” (s.l.) el descrito de acuerdo a la ley 43 de Sanidad Vegetal del 20 de Noviembre de 2002, en el cual incluye las enfermedades dentro del concepto “plaga”), que con una incidencia muy baja son capaces de provocar daños irreversibles en la planta afectada, o incluso provocar la muerte. Por el contrario se puede observar con frecuencia insectos en plantaciones truferas capaces de habitar sin causar daños.

Tabla 1.1.- Relación de todas las plagas y enfermedades identificadas en el presente capítulo, en la que se describe la zona de la planta afectada, el agente nocivo causante de la enfermedad, las pautas para la identificación, la incidencia según tres niveles cualitativos (media-alta-baja), el nivel de daño que supone la plaga cuando hay un ataque en tres niveles cualitativos (alto-medio-bajo), y las consecuencias que supone la presencia del agente nocivo.

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema	
Invernadero	Parte aérea	<i>Erysiphe alphitoides</i>	Hojas cubiertas con una masa de micelio y conidios. Decoloración, necrosis, crecimiento desigual de los brotes	Alta	Bajo	Puede retrasar el crecimiento de las plantas pequeñas y en los casos más severos incluso llegar a causar la muerte de los plántones	
		<i>Cecidophes triternalis</i>	Malformaciones y crecimientos desordenados en brotes y yemas	Media	Alto	Rechazo del lote por incumplimiento de normativa de calidad de planta	
		<i>Aceria ilicis</i>	Erinosis en envés	Alta	Bajo	Rechazo del consumidor por presencia de manchas en envés	
		<i>Phyllonorycter belotella</i>	Hoja minadas con manchas blancas en el haz	Baja	Bajo	Rechazo del consumidor por presencia de manchas en el haz	
		<i>Phylloxera quercus</i>	Presencia de moteado amarillo en hojas	Media	Bajo	Rechazo del consumidor por presencia de moteado en hojas	
		Pulgones	Presencia de insectos y negrilla en parte aérea	Alta	Bajo	Rechazo del consumidor por presencia de insectos y negrilla	
		<i>Kermes</i> sp.	Presencia de hembras en las plantas	Baja	Alto	Debilitamiento de las plantas. Rechazo del consumidor	
	Parte radical	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Hojas festoneadas consumidas por adultos. Presencia de larvas que se alimentan de las raíces	Baja	Alto	Debilidad y muerte de las plantas afectadas	
		Hongos competidores	<i>Sphaerosporella brunnea</i>	Presencia de cuerpos fructíferos en el contenedor y/o micorrizas	Alta	Medio	Rechazo del lote dependiendo del método usado para el control de planta micorrizada
			Complejo <i>Tuber borchii</i>	Presencia de micorrizas	Baja	Alto	Rechazo del lote

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema	
Invernadero	Parte radical	Hongos competidores	<i>Trichophaea woolhopeia</i>	Presencia de micorrizas	Baja	Medio	Rechazo del lote dependiendo del método usado para el control de planta micorrizada
			<i>Tuber brumale</i>	Presencia de micorrizas	Baja	Alto	Rechazo del lote
			<i>Pulvinula constellatio</i>	Presencia de cuerpos fructíferos en el contenedor y/o micorrizas	Baja	Alto	Rechazo del lote dependiendo del método usado para el control de planta micorrizada
	Bellotas	<i>Curculio elephas</i> <i>Curculio glandium</i>	Presencia de larvas y orificios en bellotas. Heces compactas en el interior de las mismas	Alta	Alto	Pérdidas económicas debido a fallos en la germinación de las bellotas	
		<i>Cydia fagiglandana</i>	Presencia de larvas y orificios en las bellotas. Excrementos granulados en el interior de las mismas	Alta	Alto	Pérdidas económicas debido a fallos en la germinación de las bellotas	
		<i>Apodemus sylvaticus</i> <i>Microtus sp.</i>	Semillero vacío o removido	Baja	Alto	Fallos importantes en el semillero	
	Daños abióticos		Síntomas en función del agente causal (heladas, sequía...)	Alta	Alto	Daños en función del agente causal	
Plantaciones	Parte aérea	<i>Kermes ilicis</i> <i>Kermes vermilio</i>	Presencia de hembras en ramillas y tronco	Media	Medio	Debilitamiento de la planta e incluso muerte en caso de ataques persistentes	
		<i>Targionia vitis</i>	Presencia en tallos y ramas, especialmente debajo de la corteza	Baja	Bajo	Debilitamiento de la planta	
		<i>Coroebus florentinus</i>	Ramas de color marrón amarillento, evolucionando posteriormente a un tono rojizo. Presencia de galerías en espiral alrededor de la rama	Baja	Bajo	Desequilibrio entre la partes aérea y radicular debido a las galerías, que interrumpen el flujo de savia. Debilitamiento de la planta. Ramas frágiles	
		<i>Cossus cossus</i>	Presencia de serrín y / o excrementos. Presencia de larvas y galerías debajo de la corteza	Baja	Medio	Desequilibrio entre las partes aéreas y las raíces debido a las galerías, que interrumpen el flujo de savia. Debilitamiento de la planta. Ramas frágiles	

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema
Plantaciones	Parte aérea	<i>Kermes ilicis</i> <i>Kermes vermilio</i>	Presencia de serrín y / o excrementos. Presencia de larvas y galerías debajo de la corteza	Baja	Medio	Desequilibrio entre las partes aéreas y las raíces debido a las galerías, que interrumpen el flujo de savia. Debilitamiento de la planta. Ramas frágiles
		<i>Zeuzera pyrina</i>	Presencia de larvas recién nacidas en ramillas jóvenes, que se encontrarán más tarde en ramas o troncos más grandes	Baja	Medio	Desequilibrio entre las partes aéreas y las raíces debido a las galerías, que interrumpen el flujo de savia. Debilitamiento de la planta. Ramas frágiles
		<i>Cecidophes</i> sp.	Malformaciones en brotes y crecimiento desordenado de los mismos	Baja	Bajo	Debilitamiento y malformaciones en las plantas afectadas
		<i>Aceria ilicis</i>	Erinosis en hojas. Las hojas afectadas inicialmente toman un color amarillento que posteriormente se torna en marrón oscuro	Alta	Bajo	Las plántulas normalmente no sufren excesivamente con este patógeno
		<i>Phyllonorycter belotella</i>	Hojas minadas en el haz	Baja	Bajo	Debilitamiento de las plantas afectadas
		<i>Phylloxera quercus</i>	Punteado amarillento y marrón en las hojas. Amarilleamiento generalizado del follaje y caída prematura de las hojas	Media	Bajo	Normalmente carece de relevancia, pero ataques continuados en plantas jóvenes pueden llegar a reducir el vigor
		Pulgones	Presencia de pulgones en los brotes, acompañados de melaza	Alta	Bajo	Debilitamiento de la planta
		<i>Microtus duodecimcostatus</i> <i>Microtus arvalis</i>	Heridas en cuello de la planta y en los carpóforos	Baja	Medio	Muerte de la planta si producen anillamiento. Pérdidas en la cosecha de carpóforos.
		<i>Cerambyx</i> sp.	Presencia de galerías en la base del tronco	Baja	Medio	Rotura de ramas con viento y nevadas

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema
Plantaciones	Parte aérea	<i>Candidatus phytoplasma</i>	Presencia de malformaciones en ramas y tronco	Media	Medio	Debilitamiento de la planta, incluso la muerte si los tumores afectan el tronco
		<i>Brenneria quercina</i>	Exudados en tallos, ramas, ramillas o bellotas	Baja	Bajo	Perturbación del proceso de crecimiento vegetativo
		<i>Taphrina kruchii</i>	Hojas más pequeñas y cloróticas. Ramitas cortas agrupadas	Baja	Bajo	Caída de las hojas anómalas
		<i>Botryosphaeria stevensii</i> (anamorfo <i>Diplodia mutila</i>)	Grupos de hojas cloróticas en algunas ramas	Baja	Bajo	Muerte de brotes y ramas
		<i>Lymantria dispar</i>	Deposiciones de huevos de insectos en superficies verticales o sobresalientes, generalmente troncos, y nunca en la base del mismo	Baja	Medio	Defoliación severa. Debilitamiento de la planta, que a veces conduce a enfermedades y/o muerte
		<i>Tortix viridiana</i>	Síntomas visibles en las copas de los árboles, incluida la defoliación completa cuando las poblaciones son elevadas	Baja	Bajo	Debilitamiento de la planta. Reducción de la producción de bellota
		<i>Euproctis chryorrhoea</i>	Defoliación. Larvas gregarias y altamente urticantes, que tejen una red muy visible a su alrededor	Baja	Bajo	Defoliación causada por larvas, que comen los brotes y las hojas jóvenes. Debilitamiento de la planta
		<i>Lachnaia hirta</i>	Presencia de larvas alimentándose de brotes	Media	Bajo	Debilitamiento de la planta. Malformaciones
		<i>Labidostomis</i> spp.	Presencia de adultos en la copa del árbol	Baja	Bajo	Defoliación, disminución de la floración
		<i>Luperus sulphuripes</i>	Hojas con orificios	Baja	Bajo	Pérdida de masa foliar
		<i>Polydrusus setifrons</i>	Se alimentan del parénquima, dejando las venas de las hojas intactas	Baja	Bajo	Debilitamiento de la planta. Reducción del vigor
		<i>Tropinota squalida</i>	Presencia de adultos en parte aérea, principalmente en el interior de los protectores	Alta	Bajo	Daños en brotes y flores

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema
Plantaciones	Parte aérea	<i>Acrocercops bronniardellus</i>	Plantas con haz minado	Baja	Bajo	Disminución de capacidad fotosintética
		<i>Attelabus nitens</i>	Hojas enrolladas en forma de canutillo	Baja	Bajo	Pérdida de masa foliar
		<i>Aceria ilicis</i>	Erinosis en hojas. Las hojas afectadas inicialmente se vuelven de un color amarillento que luego evoluciona a un marrón oscuro	Alta	Bajo	Hojas ligeramente deformadas. Engrosamientos y deformaciones en inflorescencias
		<i>Venturia oleaginea</i>	Manchas marrones en haz principalmente	Media	Bajo	En ataques severos puede provocar defoliaciones
		Pulgones (<i>Myzocallis boernerii</i> y <i>Lachnus longirostris</i>)	Presencia de pulgones en los brotes, frecuentemente acompañados de negrilla	Alta	Bajo	Debilitamiento de la planta
		<i>Phylloxera quercus</i>	Manchado amarillo y marrón de las hojas. Pardeamiento general del follaje y caída prematura de la hoja	Media	Bajo	Normalmente no tiene importancia en plantaciones viejas, pero los ataques persistentes en árboles jóvenes reducen el vigor de la planta
		Agallas	Presencia de agallas, malformaciones o engrosamientos	Media	Bajo	Malformaciones y alteraciones en ramitas, tallos, hojas y amentos
	Parte radical	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Hojas festoneadas consumidas por adultos. Presencia de larvas que se alimentan de las raíces	Baja	Bajo	En campo no origina graves problemas
		<i>Vesperus</i> sp.	Coloración marrón rojiza de la planta. Presencia de larvas en las plantas	Baja	Medio	Muerte de la planta
		Gusanos blancos: <i>Melolontha</i> sp. <i>Anoxia</i> sp.	Presencia de larvas en el sistema radicular. Coloración marrón rojiza de la planta	Baja	Alto	Muerte de la planta

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema	
Plantaciones	Parte radical	<i>Capnodis tenebrionis</i>	Presencia de adultos en parte aérea y de galerías en base de tronco causada por larvas	Baja	Bajo	Los adultos se alimentan de brotes, causando crecimientos desiguales. Las larvas excavan galerías causando interrupción de flujo de savia	
		<i>Microtus</i> sp.	Corteza roída, follaje seco	Baja	Media	Daños en corteza. Si se produce el anillamiento completo de la planta, provoca la muerte	
		<i>Apodemus sylvaticus</i>	En plantas jóvenes, corteza roída, follaje seco	Baja	Baja	En plantas jóvenes daños en corteza. Si se produce el anillamiento completo de la planta, provoca la muerte	
		Putridiones blancas: <i>Armillaria mellea</i> <i>Rosellinia necatrix</i>	Disminución del vigor, follaje amarillento, tamaño y número de hojas reducidos. Micelio en raíces	Baja	Alto	Debilitamiento e incluso la muerte de la planta	
		Competidores	<i>Trichophaea woolhopeia</i>	Presencia de micorrizas	Alta	Medio	Colonización de los ápices radicales, evitando la presencia de <i>T. melanosporum</i> en ellos
			<i>Pisolithus arhizus</i>	Presencia de micorrizas. En algunos casos, aparición de setas	Media	Bajo	Colonización de los ápices radicales, evitando la presencia de <i>T. melanosporum</i> en ellos
			<i>Quercirrhiza squamosa</i>	Presencia de micorrizas	Media	Bajo	Colonización de los ápices radicales, evitando la presencia de <i>T. melanosporum</i> en ellos
			<i>Tuber brumale</i>	Presencia de micorrizas. En algunos casos, aparición de cuerpos fructíferos	Baja	Alto	Producción de trufas no deseables en plantaciones
	Fauna silvestre (mamíferos)	Plantas jóvenes rotas y ramoneadas. Alteración del suelo. Vallado deteriorado	Alta	Alto	Muerte de raíces, disminución de la producción de trufa		

Fase de cultivo	Zona afectada	Agente nocivo	Descripción	Incidencia	Nivel daño	Consecuencias cuando ocurre el problema
Plantaciones	Daños abióticos	Heladas	Lesiones en hojas, secándose desde el borde hacia el interior. Brotes ennegrecidos	Alta	Medio	Debilitamiento de la planta. Retraso en crecimiento y producción. En casos severos, muerte
		Granizo	Pérdida de masa foliar. Lesiones en ramas	Alta	Bajo	Defoliación y disminución en el crecimiento y vigor. Entrada de patógenos por heridas
		Nieve	Acumulación de nieve en ramas	Media	Bajo	Rotura de ramas
		Falta de adaptación	Enanismo, microfilia, clorosis	Baja	Alto	Debilitamiento de la planta. Retraso en crecimiento y producción. En casos severos, muerte
	Otros daños	Caracoles	Presencia de caracoles en tronco y sistema de riego	Baja	Bajo	Impide la salida del agua de riego, obturando las bailarinas
		Avispa (<i>Polistes gallicus</i>)	Presencia de avisperos en protectores	Alta	Bajo	Puede provocar picaduras al tratar de manipular los protectores
Postcosecha	Carpóforos	<i>Leiodes cinnamomeus</i>	Presencia de galerías y larvas en trufas	Alta	Alto	Devaluación de la trufa, descenso en el peso de la trufa, pudrición de carpóforos
		Moscas de la trufa: <i>Helomyza tuberivora</i> <i>Megaselia</i> sp. <i>Drosophila funebris</i>	Presencia de galerías y larvas en trufas	Alta	Alto	Devaluación de la trufa, descenso en el peso de la trufa, pudrición de carpóforos
		<i>Pleurophorus</i> sp.	Presencia de insectos en trufas	Baja	Bajo	Propagación de microorganismos que causan la pudrición de la trufa
		<i>Ommatoiulus sabulosus</i>	Presencia de insectos en trufas	Baja	Bajo	Propagación de microorganismos que causan la pudrición de la trufa
		Topillos (<i>Microtus duodecimcostatus</i>)	Daños en carpóforos y galerías en suelo	Baja	Medio	Pérdida de cosecha

1.- Plagas asociadas a viveros

En cuanto a la producción de planta en viveros, se han detectado hongos patógenos, hongos competidores con las micorrizas de *T. melanosporum* y artrópodos asociados al cultivo propio de un invernadero.

1.1.- Daños originados en la parte aérea

El oidio (*Erysiphe alphitoides* Griffon & Maublanc) U. Braun & S. Takam es una enfermedad ampliamente extendida en Asia y Europa (Braun *et al.*, 2007) en numerosas especies del género *Quercus* (Braun, 1995), y ha sido introducida en otras partes del mundo. Es común su aparición en plantas instaladas en campo, aunque también aparece con relativa frecuencia en robles (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matts.) Liebl., *Quercus faginea* Lam o *Quercus humilis* Mill.) en fase de vivero (Fig. 1.6). Su proliferación suele estar relacionada con un exceso de humedad, y su tratamiento es con azufre o derivados (Zambonelli, 1993). Este procedimiento, aunque efectivo, es necesario llevarlo a cabo con las precauciones necesarias al tratarse de plantas inoculadas con trufa negra, ya que este tratamiento antifúngico puede comprometer la correcta micorrización.

Existen otros artrópodos capaces de provocar daños que impiden la comercialización de la planta debido al incumplimiento de la normativa vigente en cuestión de calidad de planta forestal (Peñuelas, 1993 y 1995), como los ácaros eriófidos. Es el caso de:

- *Cecidophes tristernalis* Nalepa: vive en los brotes y yemas provocando malformaciones en los mismos, provocando crecimientos desordenados que son especialmente dañinos en planta de vivero.
- *Aceria ilicis* Canestrini (Fig. 1.6): se aloja en las hojas e inflorescencias, ocasionando alteraciones y daños que no suelen ser relevantes para la planta. En el envés de las hojas afectadas produce erinosis, que consiste en manchas prominentes de color rojizo.

Lepidópteros como el minador *Phyllonorycter belotella* (Staudinger, 1859) (Fig. 1.6), el homóptero *Phylloxera quercus* (Boyer de Fonscolombe, 1834) (Fig. 1.6), o diferentes especies de pulgones, son relativamente frecuentes en viveros de producción de planta micorrizada. Los daños no suelen ser relevantes, no llegando a debilitar en exceso al plantón afectado. Sin embargo, sí que ocasionan pérdidas económicas debido al rechazo del consumidor ante una planta que presenta signos de enfermedad.

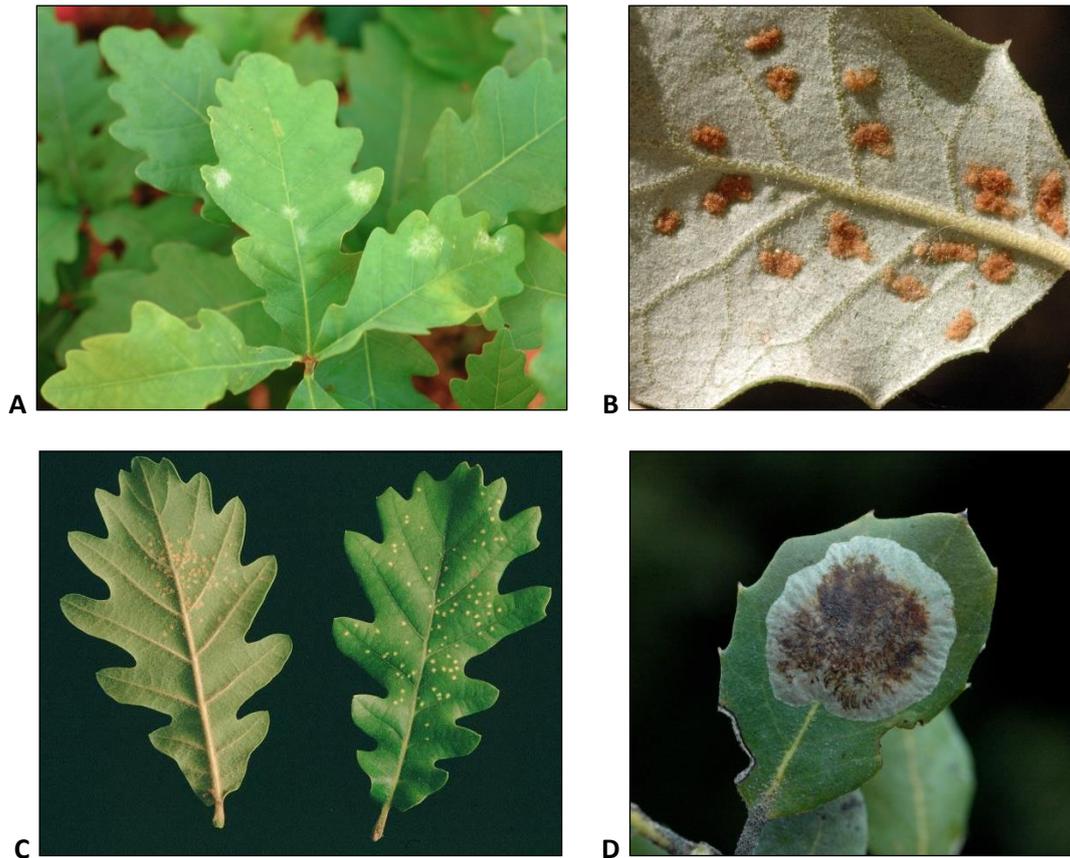


Figura 1.6.- Oidio en plántulas de invernadero (A). Síntomas de eriosis producidas por el ácaro *Aceria ilicis* (B). *Phylloxera quercus* en hojas de quejigo (*Quercus faginea*) en vivero (C). Daños causados por *Phyllonorycter belotella* en encina (D).

Aunque con carácter anecdótico, se han localizado en plantas de vivero cochinillas de la encina, tanto *Kermes vermilio* (Planchon, 1864) como *Kermes ilicis* (Linnaeus, 1778). En el apartado de *Plagas asociadas a plantaciones truferas* se desarrollarán ambos artrópodos.

1.2.- Daños originados en la parte radical

Artrópodos

Se han encontrado daños puntuales en vivero producidos por el coleóptero curculiónido *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius, 1775) (Fig. 1.7), comúnmente denominado “gorgojo de la vid”. Se trata de una de las principales plagas en plantas ornamentales y viveros de todo el mundo (Van Tol *et al.*, 2004; Moorhouse *et al.*, 2008). Este insecto se alimenta en estado larvario de las raíces, y en su fase adulta de las hojas. Los daños irreversibles los realiza en la parte radical, inutilizando los plantones para su comercialización. La mayor parte de veces los daños se visualizan cuando el problema ya no tiene solución.



Figura 1.17. - Tallo seccionado debido a la alimentación de las larvas de *Otiorrhinchus sulcatus* en planta de vivero (Izquierda). Síntomas de la planta atacada por este insecto (Derecha).

Los adultos poseen los élitros fusionados, miden entre 8 y 10 mm y son de color negro con una pubescencia dorada muy fina, formando manchas en los élitros. Durante el día se refugian en lugares más frescos, en el sustrato de las plantas. Aquí encuentran refugio, sombra y mayor humedad, ascendiendo a la parte aérea por la noche, alimentándose del limbo foliar de una forma muy característica. (Van Tol y Visser, 2002). Las larvas son ápodas, blancas y con la cabeza de color castaño.

Actualmente no existe ningún producto autorizado para este insecto en cultivos forestales, aunque el control con nematodos entomopatógenos ha resultado eficaz (Bedding y Miller, 1981; Guy *et al.*, 2017).

Micorrizas competidoras

Pese a no ser patógenos, en este trabajo, los hongos micorrícicos presentes en el vivero y que son capaces de competir con las micorrizas de *T. melanosporum* se han considerado agentes nocivos. El motivo son las pérdidas económicas que causan en la fase de producción de planta debido al rechazo para la venta de los lotes cuando no cumplen los criterios de calidad micorrícica establecida por las diferentes metodologías de evaluación de planta micorrizada empleadas en Europa y recopiladas por Andrés-Alpuente *et al.*, (2014).

El hongo contaminante de vivero más frecuentemente identificado en los controles de calidad de planta micorrizada es *Sphaerospora brunnea* (Alb. & Schwein.) Svrček y Kubička. Este ascomiceto (Fig. 1.8) es un hongo pionero capaz de formar micorrizas más rápidamente que *T. melanosporum*, dificultando la correcta colonización de éste último en las raíces de la planta huésped. De esta forma limita la calidad de las plantas pudiendo llegar a causar grandes pérdidas económicas (Sánchez, 2012). Es muy frecuente encontrar plantones que contienen micorrizas de esta especie, aunque se puede controlar su incidencia de modo relativamente sencillo si se manejan correctamente las condiciones temperatura y humedad (Sánchez *et al.*,

2014a). Sin embargo se trata de una especie muy poco competitiva en condiciones de campo y no suele causar problemas en plantaciones (Hall *et al.*, 2007).



Figura 1.8.- Carpóforos de *Sphaerosporella brunnea* en plantones micorrizados con *Truber melanosporum*.

La presencia de hongos pertenecientes al Complejo *Truber borchii* Vittad., así como de *Trichophaea woolhopeia* (Cooke & W. Philips) Boud. (Fig. 1.9) suele ser debida a la utilización en el sustrato de tierra procedente de zonas forestales insuficientemente desinfectada (García-Barreda, 2011). En el caso de ser identificada en plantas de invernadero alguna especie perteneciente al Complejo *Truber borchii* no se permitiría el paso de ninguno de los controles de calidad propuestos por tratarse de una especie de género *Truber*. Ambas especies podrían permanecer durante la fase de campo, pudiéndose encontrar en árboles de avanzada edad (Sánchez, 2012).

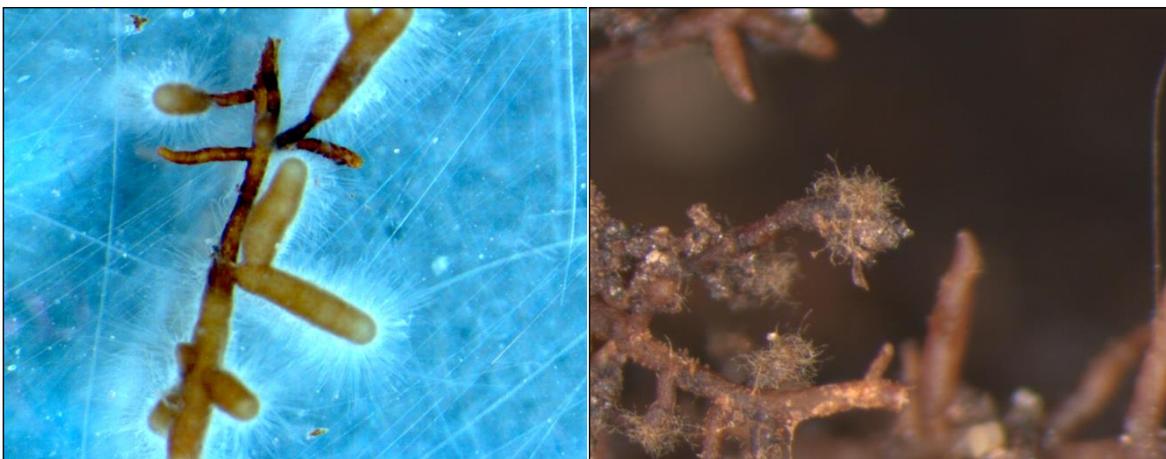


Figura 1.9.- Micorrizas pertenecientes al Complejo *Truber borchii* (Izquierda), y a *Trichophaea woolhopeia* (Derecha).

Pueden detectarse otras especies comestibles del género *Tuber*, como la trufa machenca (*Tuber brumale* Vittad.) o la trufa de verano (*Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng) (Fig. 1.10). En ambos casos su presencia en planta de vivero se debe a un error en la selección de inóculo por parte del viverista. Ambas especies podrían permanecer también en la fase de campo, pudiendo causar graves problemas en la plantación, cambiando la vocación de la misma, principalmente *T. brumale*.



Figura 1.10.- Micorrizas de *Tuber brumale* (Izquierda) y de *Tuber aestivum* (Derecha).

Pulvinula constellatio (Berk. & Broome) Boud. (Fig. 1.11) es un ascomiceto de la familia de los Pezizales capaz de establecer relaciones simbióticas con raíces de diferentes géneros. Su rapidez de colonización le permite desarrollarse en viveros de producción de planta micorrizada, siendo capaz de formar carpóforos en los contenedores, completando su ciclo y dispersándose de este modo en las instalaciones. Es una de las especies estrechamente vinculadas a la producción de planta micorrizada con trufas en otros países europeos (Amicucci *et al.*, 2001), pero hasta esta tesis doctoral no había sido detectada en los viveros españoles



Figura 1.11.- Imagen a estereoscopio de micorrizas de *Pulvinula constellatio*.

Se trata de un hongo que está causando inquietud en el sector debido al desconocimiento de su comportamiento en vivero, y por tanto de su control. Hay una gran cantidad de trabajos relacionados con *S. brunnea*, el hongo competidor más frecuente en viveros españoles. Existen artículos sobre su gestión (Sánchez et al., 2014a) e incluso su genoma está secuenciado (Benucci et al., 2019). Pero en el caso de *P. constellatio* la inquietud reside en la carencia de información que permita su prevención o su gestión una vez producida la contaminación. Este hecho motivó la necesidad de profundización que se acometió en el capítulo 2.

1.3.- Daños originados en las bellotas

Debido a su gran tamaño y su contenido en nutrientes, lípidos y carbohidratos, las bellotas son un buen recurso alimenticio. Por ello es frecuente detectar algunos insectos fitófagos como los coleópteros curculiónidos *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) (Bonal et al., 2007) y *Curculio glandium* (Marsham, 1802) (Fig. 1.12) o el lepidóptero tortricido *Cydia fagiglandana* (Zeller, 1841) (Torres Villa et al., 2008). Estos insectos son capaces de provocar una importante disminución en la germinación y comprometer el desarrollo del plantón, aunque en ningún caso suelen afectar al embrión (Soria, 1996).



Figura 1.12.- Larva de curculiónido en el interior de una bellota (Izquierda). Orificio de salida (Derecha).

En casos puntuales se han sufrido en los semilleros de viveros de producción de planta micorrizada ataques del ratón de campo, *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), tal y como puede observarse en la figura 1.13.



Figura 1.13.- Daños provocados por ratones en bellotas, donde han seccionado la raíz pivotante (Izquierda). Estado de los alveolos después de un ataque de ratón en un vivero de producción de planta micorrizada (Derecha).

Una incorrecta gestión de las instalaciones puede dar lugar a daños abióticos causados por heladas, exceso o déficit hídricos o a clorosis debida a deficiencia de nutrientes en el sustrato. Por otra parte una inadecuada ubicación del vivero y un endurecimiento escaso de las plántulas puede comprometer la supervivencia de las plantas en campo (Mollá *et al.*, 2003), favoreciendo la muerte de las mismas por heladas o por déficit hídrico.

2.- Plagas asociadas a plantaciones truferas

A lo largo de estos últimos años han aparecido en plantaciones diferentes plagas, algunas capaces de debilitar la planta, y otras incluso capaces de matarla. Además, son frecuentes los daños abióticos debidos a estrés hídrico, sequía, nieve o desequilibrios en general entre parte aérea y parte radical.

2.1.- Daños identificados en la parte aérea

2.1.1.- Daños en tronco y ramas

Cochinillas

Una de las especies más conocidas por el sector son las cochinillas *K. vermilio* y *K. ilicis* (Fig. 1.14). Son capaces de provocar importantes daños en ramas y troncos. Con una elevada incidencia, estos hemípteros son uno de los principales agentes patógenos en las plantaciones españolas. Como todos los insectos chupadores, los daños directos se asocian a la succión de savia. Estas cochinillas debilitan al árbol infestado provocando un amarilleamiento progresivo en hojas y ramilletes terminales afectados y reduciendo el número de brotes (Malumphy, 2008; Spodek y Ben-Dov, 2012). Los daños ocasionados por un ataque masivo de este insecto no suelen comprometer la supervivencia de la planta, aunque se puede llegar a producir una pérdida total de follaje (Martín Bernal *et al.*, 2002; Malumphy, 2008), provocando una disminución de la actividad fotosintética, y por tanto dificultando el destino de recursos

alimenticios a las propias trufas (Le Tacon *et al.*, 2013).



Figura 1.14.- Árbol afectado por *Kermes vermilio* en el que se observan ramillas secas (Izquierda). Detalle de rama con ninfas (naranja) y capullos blancos protectores de los machos (blanco) (Derecha).

Su capacidad de desplazamiento no es suficiente para moverse de un árbol a otro, por lo que el viento y las aves tienen un papel importante en la expansión de este insecto (García Marí *et al.*, 1989). Actualmente no existe ningún tratamiento fitosanitario autorizado para el control de esta plaga, pero se ha identificado una gran cantidad de parásitos depredadores, por lo que cualquier medida de control deberá ser respetuosa con esta fauna auxiliar. Uno de los métodos empleados en la actualidad es la poda y quema de las ramillas afectadas, y el empleo de métodos alternativos de control, como las sustancias tensoactivas (Romeo, 2014).

Otra cochinilla con menor incidencia es *Targionia vitis* (Signoret, 1876) (Fig.1.15). Sin embargo, se ha llegado a observar en campo que cuando las poblaciones se multiplican llegan a cubrir la superficie de ramas y tronco, pudiendo incluso secar los árboles afectados.



Figura 1.15.- *Targionia vitis* en tronco de encina.

Perforadores

El buprésido *Coroebus florentinus* (Herbst, 1801), comúnmente denominado “culebrilla de las ramas” (Fig. 16), perfora galerías en espiral alrededor de la corteza interna de las ramas, interrumpiendo el flujo de savia y provocando consecuentemente su muerte (Montoya, 1988). Afecta a diferentes especies de *Quercus* (Cárdenas y Gallardo, 2012), y podría estar asociado a hongos patógenos, concretamente con *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., al encontrarse con frecuencia en la misma planta y sobre el mismo tejido (Tiber *et al.*, 2002). También causa un desequilibrio entre la parte aérea y la raíz. Se recomienda la corta y destrucción de las ramas afectadas para evitar la propagación de la plaga antes de la emergencia de los adultos. Cualquier tratamiento químico en este tipo de insectos cuyas larvas habitan en el interior de los árboles es habitualmente inútil o no produce efectos evidentes.

Los lepidópteros de la familia *Cossidae*: *Cossus cossus* (Linnaeus, 1758) y *Zeuzera pyrina* (Linnaeus, 1761) (Fig. 1.16) pueden atacar a los brotes jóvenes. Si afectan a la planta en el segundo o tercer año, pueden llegar a matarla. Se pueden observar en el pie de los troncos afectados montones de serrín. Su control químico es complicado por desarrollar la mayor parte de su ciclo en el interior de ramas y tronco (Shamseldean *et al.*, 2009).

Los cerambícidos (Fig. 1.16) *Cerambix welwnsii* (Kuster, 1846) y *Cerambix cerdo* (Linnaeus, 1758) suelen afectar a plantas debilitadas o sometidas a algún estrés. *C. cerdo* suele atacar a los árboles decrepitos o decadentes, aunque la realización de podas abusivas o mal ejecutadas favorecen el ataque de árboles jóvenes, ya que las secciones de poda sin cicatrizar son el lugar idóneo para la puesta de las hembras (Sánchez *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2005). Ocasionalmente ocasionan problemas a largo plazo, provocando la rotura de ramas o el quebrado de fustes por la acción del viento (Núñez-Vázquez, 2007). En plantaciones truferas se han encontrado en pies no adaptados, y en parcelas con suelos muy poco profundos que no han permitido el correcto desarrollo del pie simbiote. El control químico no está permitido. Además, *C. cerdo* está incluido en el Anexo II de especies de interés comunitario de la Directiva Hábitats (Directiva 92/43/ CEE del Consejo de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats y de la fauna y flora silvestres).

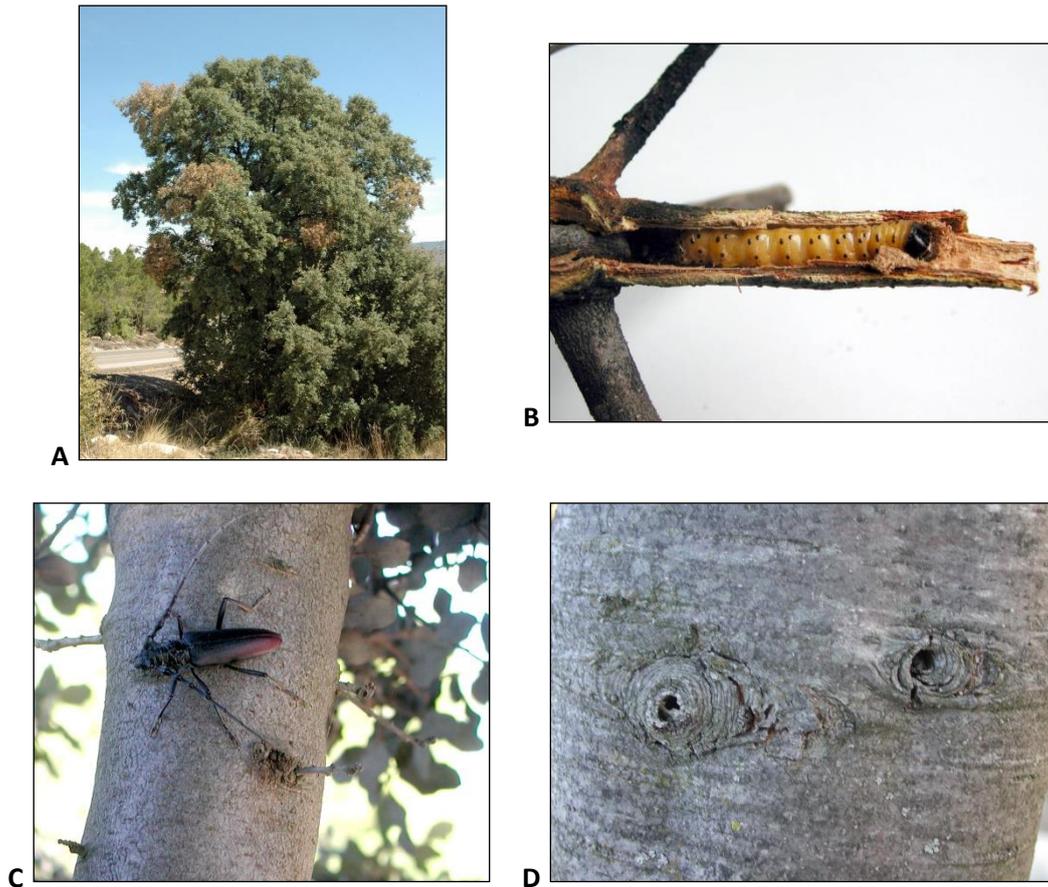


Figura 1.16.- Daños característicos producidos por larvas de *Coroebus florentinus*, que causan anillamiento de las ramas (A). Larva de *Zeuzera pyrina* en el interior de una rama de encina (B). Adulto de cerambícido sobre encina (C). Galerías de salida de cerambícido (D).

Enfermedades (Bacterias, hongos y fitoplasmas)

Mención especial merece la proliferación en estos últimos años de unas malformaciones tumorales que aparecen en ramas y tronco de encina (*Q. ilex*), identificado tal y como se desarrolla en el Capítulo 3 del presente trabajo como *Candidatus phytoplasma* (Martín-Santafé *et al.*, 2014a).

Muy característicos son los daños producidos por la bacteria *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth) (Fig. 1.17) (Biosca *et al.*, 2003). Los frutos tienen un desarrollo anormal con exudados de sabia (Perez-Izquierdo y Pulido, 2013). También produce en la corteza del tronco en especies del género *Quercus* pequeñas lesiones longitudinales de unos pocos centímetros, produciéndose exudados, especialmente durante la primavera y el otoño.



Figura 1.17.- *Brenneria quercina*. Imagen de exudado en tronco (Izquierda). Detalle de exudación "salivosa" (Derecha).

Taphrina kruchii (Vuill.) Sacc. (Fig. 1.18) se hospeda principalmente en encinas (*Q. ilex*) provocando un elevado desarrollo de las ramillas cortas, dando pie a un efecto conocido como "escoba de brujas" (Muñoz y Rupérez, 1987). Cuando crecen las hojas nuevas son más pequeñas y de aspecto clorótico.

Diplodia mutila causa la muerte de ramillas, y en ocasiones de ramas de diámetro de 5-6 cm, afectando a especies leñosas y en menor medida, a especies arbustivas leñosas (Von Arx, 1987). Se trata de un patógeno oportunista asociado a la seca de la encina (Manion, 1991). La presencia de heridas o aperturas naturales permiten su entrada a los tejidos vivos.

Botryosphaeria stevensii Shoemaker (Fig. 1.18) es un hongo capaz de provocar la muerte de ramillos y ramas. Los primeros síntomas empiezan con la presencia de grupos de hojas cloróticas. Estas van pasando a tonalidades pardas. En las ramas la corteza se necrosa apareciendo heridas longitudinales. Debajo de la corteza enferma, la madera adopta un color pardo-rojizo. Los árboles atacados muestran ramillos puntisecos y muerte descendente de las ramas.



Figura 1.18.- Síntomas producidos por *Taphrina kruchii* en escoba de brujas (Izquierda) y por *Botryosphaeria stevensii*, provocando un característico mosaico en tronco (Derecha).

2.1.2.- Daños en hojas

Defoliadores y minadores

Dentro del complejo de defoliadores existe un gran número de insectos fitófagos. La mayoría de ellos son lepidópteros. Tres de los insectos más voraces, aunque poco frecuentes en plantaciones truferas españolas son los lepidópteros *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Fig. 19), *Tortrix viridiana* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1.19) y *Euproctis chrysorrhoea* (Linnaeus, 1758) (Fig. 19). En el caso de *L. dispar* y *E. chrysorrhoea* se trata de dos especies polífagas (Schultz y Lechowicz, 1986; Frago *et al.*, 2010), mientras que *T. viridiana* está restringida a las especies del género *Quercus* (Du Merle, 1998). Se trata de una de las plagas más importantes de la encina (Soria y Notario, 1990). Puede llegar a provocar daños severos en plantaciones, alimentándose primeramente de las yemas y pudiendo provocar incluso la defoliación completa del árbol.

El control de lepidópteros con la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* se ha demostrado un tratamiento eficaz en estadios larvarios jóvenes (Johnson *et al.*, 1995).

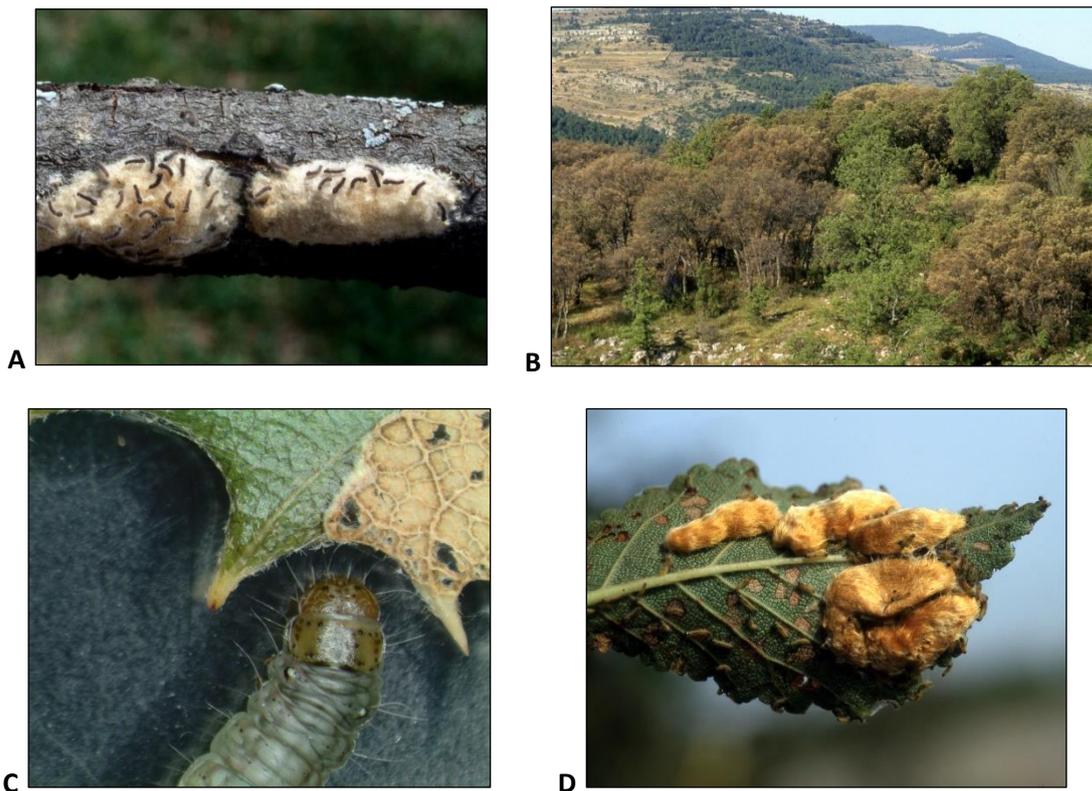


Figura 1.19.- Orugas recién nacidas de *Lymantria dispar* sobre su capullo sedoso (A). Daños producidos por *L. dispar* en monte (B). Larva de *Tortrix viridiana* alimentándose de encina (C). Orugas recién nacidas de *Euproctis chrysorrhoea* sobre su capullo sedoso (D).

Lymantria dispar (Linnaeus, 1758) es una especie polífaga, capaz de alimentarse de alrededor de 300 especies de coníferas y caducifolias (Liebhold *et al.*, 1995; Tobin y

Liebhold, 2011), tratándose de una de las plagas defoliadoras más importantes del hemisferio Norte (Staudt y Lhoutellier, 2007; Mc Ewan *et al.*, 2009). Si las poblaciones son muy elevadas la oruga acabará alimentándose de las hojas viejas, produciendo la defoliación total (Lukić *et al.*, 2017), y llegando a producirse la muerte de los pies afectados cuando la defoliación afecta a más del 50% de la masa foliar (Rozhkov *et al.*, 1991).

Euproctis chrysorrhoea (Linnaeus, 1758) es un lepidóptero muy voraz y polífago, especialmente en primavera. Se trata de una plaga en agricultura y áreas forestales, y sus larvas suponen una amenaza para la salud humana, pudiendo causar reacciones alérgicas, principalmente en primavera, cuando las larvas alcanzan la madurez (Werno y Lamy 1994; Battisti *et al.*, 2011).

Hay otras especies presentes en la parte aérea bastante frecuentes en plantaciones, que suelen permanecer en bajos niveles poblacionales y solo se ha observado que son capaces de causar problemas reales cuando se produce una explosión demográfica, o cuando afectan a plantas jóvenes. Es el caso de los coleópteros crisomélidos *Lachnaia hirta* (Fabricius, 1801) (Fig. 20), *Labidostomis* spp. (Dejean, 1836) (Fig. 20), o *Luperus sulphuripes* (Graells, 1858), el coleóptero curculiónido *Polydrusus setifrons* (Jacquelin du Val, 1852) (Fig. 1.20), o el coleóptero scarabeido *Tropinota squalida* (Scopoli, 1783) (Fig. 1.20).

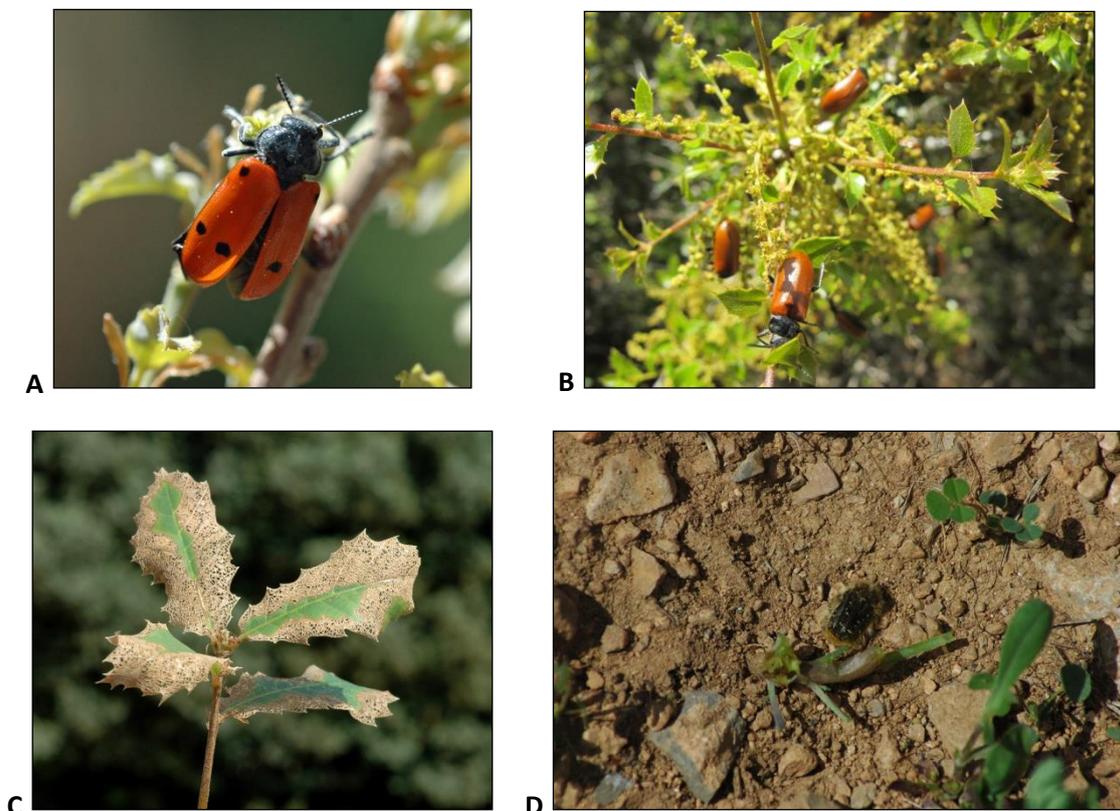


Figura 1.20.- Adulto de *Lachnaia hirta* (A). Adulto de *Labidostomis* spp.(B). Daños característicos derivados de la alimentación de *Polydrusus setifrons* en encina (C). Adulto de *Tropinota squalida* en una plantación trufera (D).

Existen otros insectos que ocasionan daños con unas sintomatologías muy características, pero que en condiciones normales no causan problemas relevantes. Las larvas del minador *Acrocercops bronniardellus* (Fabricius, 1798) (Fig. 1.21) realizan una fina y sinuosa galería en el haz de la hoja, dejando la epidermis de la zona con aspecto blanquecino.

Las hembras del gorgojo del roble *Attelabus nitens* (Scopoli 1763) (Fig. 1.21) realizan una incisión a cada lado de una hoja de roble o encina hasta cerca del nervio central, evitando que el recorte caiga (Urbanová y Urban, 2016). Seguidamente enrollan el trozo y depositan los huevos en el interior del canutillo, que se mantiene colgando durante un tiempo. Protegido en el interior del canuto de hoja de roble, el gorgojo del roble pasa por los estadios de huevo, larva y pupa.



Figura 1.21.- Daños producido por el lepidóptero *Acrocercops bronniardellus* (Izquierda). Característica puesta producida por *Attelabus nitens* en forma de canutillo (derecha).

Ácaros y hongos

Del mismo modo que se ha descrito en el apartado de vivero, en campo también es muy común la presencia de ácaros eriófidos en encinas, principalmente *Aceria ilicis* (Canestrini, 1890). La erinosis causada por los eriófidos consiste en simples invaginaciones del envés foliar, que se encuentran densamente cubiertos de los tricomas que presentan un crecimiento anormal (Estrada-Venegas, 2016).

No hay que confundir estos síntomas provocados por ácaros con los ocasionados por el hongo *Venturia oleaginea* (Castagne) Rossman & Crous (Fig. 1.22), conocido comúnmente como el répilo de la encina (Trapero *et al.*, 2010). El síntoma más característico de la infección por este hongo son unas manchas circulares o anulares que aparecen principalmente en el haz foliar, de tamaño variable y color oscuro debido al desarrollo de las esporas. Con frecuencia aparecen rodeadas de un halo amarillo o se observa clorosis en áreas extensas de las hojas. En ataques severos que originen importantes defoliaciones de los árboles afectados, se pueden realizar tratamientos fungicidas, siempre de acuerdo a los productos autorizados en ese momento por el Ministerio.



Figura 1.22.- Hojas de encina mostrando síntomas de afección del répilo de la encina (*Venturia oleaginea*).

Pulgones

La presencia de pulgones (Fig. 1.23) en plantaciones truferas suele ser frecuente. Uno de los más comunes es *Myzocallis boernerii* (Stroyan, 1957). Cuando las poblaciones de este pulgón son poco numerosas viven aislados o en grupos pequeños, y se colocan sobre los nervios centrales del envés de las hojas. Por el contrario, si las poblaciones son numerosas habitan en casi todo el envés, y también llegan a colonizar el haz, los pedúnculos, los grupos florales y la parte proximal de los frutos en desarrollo.

Lachnus longirostris (Mordvilko, 1901) es un pulgón negro de gran tamaño, con las patas de coloración menos intensa que el cuerpo. Suelen encontrarse en colonias, lo que unido a su gran tamaño provoca preocupación entre los truficultores afectados. Se concentran en las ramillas terminales en mayo - junio, y a partir del mes de julio la mayoría se desplazan al peciolo y cápside de las bellotas.

Tanto esta especie, como *M. boernerii* y el resto de insectos chupadores, como áfidos y cóccidos, al succionar la savia de las hojas provocan un debilitamiento de los árboles e incluso la disminución de la masa foliar si ésta es joven. Es característica la aparición de fumagina, caracterizada por el desarrollo de un micelio negro y asociado con la presencia de sustancias azucaradas (melaza). La aparición de estos azúcares favorece la presencia de hormigas, lo que a su vez dificulta el control de los insectos chupadores por la fauna auxiliar.

No suele ser necesario el tratamiento contra pulgones en plantaciones truferas. En caso de considerar esta necesidad, existe la opción de disminuir las poblaciones de estos insectos empleando métodos respetuosos con el medio ambiente y con la fauna auxiliar, como el jabón potásico, el aceite de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), o encalando el tronco del árbol para evitar el ascenso de las hormigas.



Figura 1.23.- Diferentes pulgones presentes en plantaciones truferas españolas. Grupo de pulgones de la especie *Lachnus longirostris* afectando a encina (Izquierda). *Myzocallis boeneri* en plantones de encina (Derecha).

Del mismo modo que se ha comentado en la fase de vivero, *P. quercus* suele aparecer en *Q. faginea*, *Q. robur* y *Q. ilex* también en plantaciones truferas. Sus síntomas son la aparición de manchas de color amarillo en las hojas, coincidentes con los puntos de succión. Estas manchas viran a color marrón con el tiempo, pudiendo llegar a provocar la caída de las hojas. Esta especie parece ser que no posee generaciones radicícolas (Barriuso *et al.*, 2012), como la filoxera de la vid, por lo que carece de verdadera importancia en el mundo de la truficultura.

Agallas

Las agallas (Fig. 1.24) se definen como estructuras anormales de partes de los tejidos u órganos de las plantas que se desarrollan por la reacción específica a la presencia o actividad de un organismo inductor (planta o animal, frecuentemente un insecto) (Meyer, 1987; Shorthouse y Rohfritsch, 1992).

Existe un gran número de especies capaces de inducir estas estructuras, entre los cuales se incluyen nemátodos, hongos, bacterias e artrópodos, siendo este último el grupo más amplio, principalmente de la familia Cynipidae. Existen cerca de 140 especies de cinípidos en la península ibérica inductores de formación de agallas, de las cuales el 70% está asociado a plantas del género *Quercus* (Nieves-Aldrey, 1998). Los daños derivados de las agallas no suelen ser graves, excepto en aquellos casos en los que un desequilibrio en el ecosistema impide a los hiperparásitos un control eficiente de la población. Algunas de las especies más frecuentes en Aragón (Del Estal *et al.*, 2006) son *Neuroterus quercusbaccarum* (Linnaeus, 1758), *Neuroterus numismalis* (Fourcroy, 1785), *Andricus quercusramuli* (Linnaeus, 1761), *Andricus quercustozae* (Bosc, 1792) *Plagiotrochus quercusilicis* (Fabricius, 1798) y *Dryomyia lichtensteinii* (F. Löw, 1878).

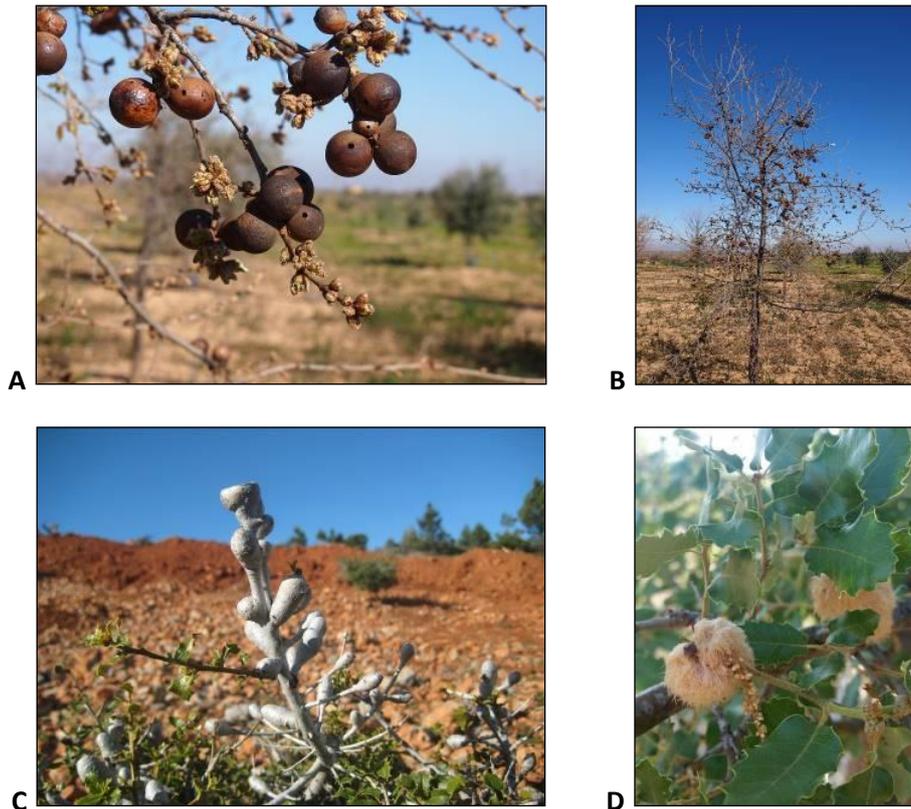


Figura 1.24.- Diferentes agallas en quercineas. *Andricus quercustozae* en quejigo (A y B). *Plagiotrochus quercusilicis* en encina (C). *Andricus quercusramuli* en quejigo (D).

2.2.- Daños en el sistema radical

2.2.1.- Artrópodos

Se han identificado en plantaciones truferas varias especies de artrópodos capaces de causar daños en raíces. De entre todos ellos cabe destacar el curculiónido *O. sulcatus* (ya mencionado en la fase de vivero), el género de cerambícidos *Vesperus* (Dejean, 1821), diferentes melóntidos de los géneros *Melolontha* (Fabricius, 1775) y *Anoxia* (Laporte, 1832) (llamados comúnmente gusanos blancos) o elatéridos conocidos como “click beetle”. Todos estos insectos son capaces de causar daños severos cuando la planta es joven, pudiendo causar su muerte. Los ataques son producidos cuando se encuentran en fase larvaria, presentando en esta etapa unas mandíbulas muy potentes.

El género *Vesperus* (Fig. 1.25) se halla integrado por especies muy polimorfas y con marcado dimorfismo sexual. Las hembras depositan los huevos en invierno en la corteza del árbol. Las larvas que avivan de los huevos se desplazan muy poco sobre la corteza hasta salir al exterior y dejarse caer al suelo, donde se entierran buscando las raíces de la planta de la que se alimentan. Al cabo de dos años, las larvas, que desarrollan toda su vida bajo tierra, ninfosan y dan lugar a nuevos adultos que salen durante el otoño (Vives, 2004).

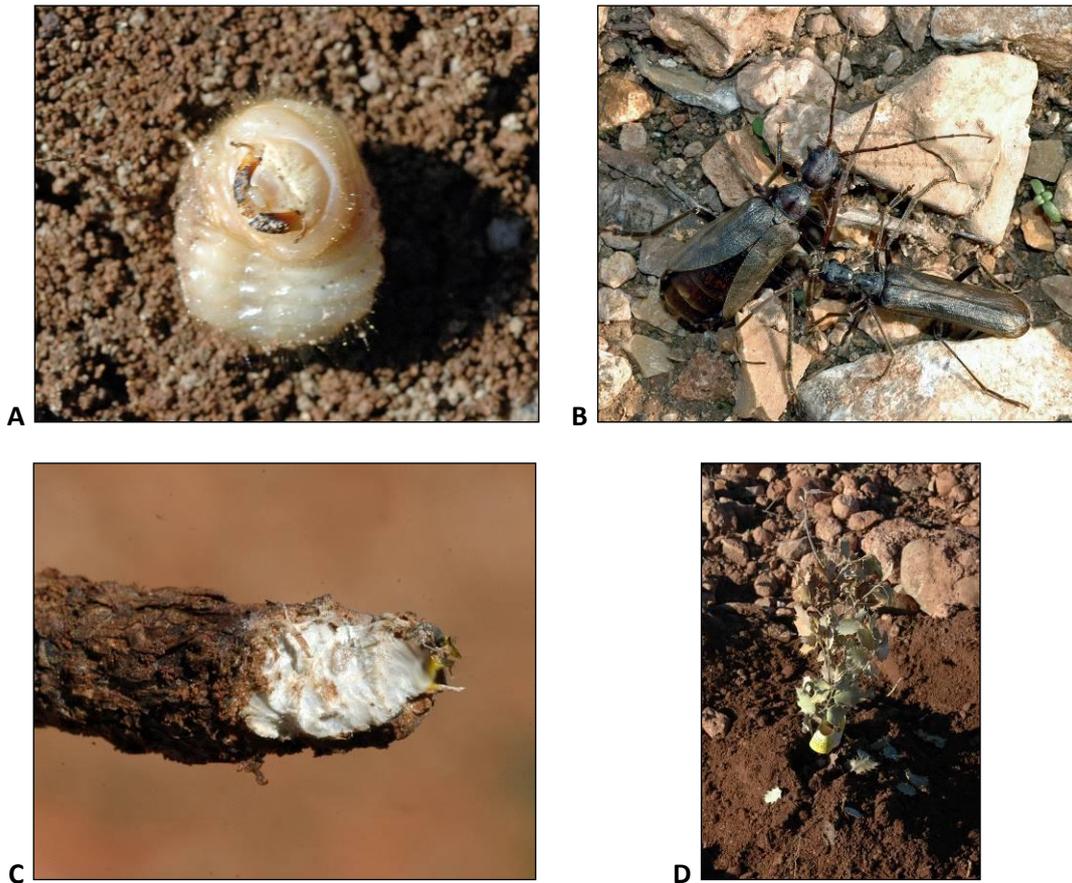


Figura 1.25.- *Vesperus* sp. en plantaciones truferas. Detalle de mandíbulas de larva (A), Adultos de macho y hembra (B). Detalle de tallo seccionado por larvas de *Vesperus* (C). Planta muerta por ataque de *Vesperus* (D).

Las larvas viven libres en el suelo y se alimentan de raíces. Algunas especies se consideran plagas importantes de las raíces de la vid y el olivo (Olmí, 1987), así como de otros géneros, tanto de especies arbóreas (Mendizabal, 1937) como herbáceas (Vives, 2004). Los adultos son activos al anochecer, y tienen una vida muy corta (unos quince días). Después del acoplamiento, el macho muere en pocas horas. Las hembras justo después de la puesta, que puede durar varias horas (Vives, 2004).

Vesperus spp. puede causar graves daños por la marcada preferencia que tiene por las plántulas jóvenes, a las cuales mata al destruir su sistema radical. Un ataque de estas características puede suponer la muerte de la planta en poco tiempo, dependiendo de la edad de la misma.

Las plantas adultas atacadas suelen mostrar síntomas que son fácilmente confundibles con otros problemas fisiológicos o fitopatológicos que causan un mal funcionamiento del sistema radical: falta de vigor, decoloración y descenso de la producción y del tamaño de los frutos, entre otros. Los ataques suelen aparecer en rodales, y los daños comienzan a realizarse coincidiendo con el avivamiento de los huevos (según las zonas, de enero a abril).

Esta plaga no es demasiado frecuente en plantaciones truferas, y suele estar relacionada con cultivos precedentes (por ejemplo, vid), previamente infestados (Lozano-García y Rodríguez-Guerra, 2015).

Las larvas de los gusanos blancos (*Melolontha* sp. y *Anoxia* sp.) pueden causar ocasionalmente daños en plantaciones jóvenes e incluso en viveros (Pérez de Obanos, 1994). Se alimentan de la raíz de las plantas de forma helicoidal, ocasionando plantas raquílicas o incluso la muerte de las mismas, teniendo preferencia por las raíces nuevas, aunque igualmente pudiendo afectar a raíces mayores y al cuello de la raíz (Alvarado *et al.*, 1996). Los árboles grandes soportan mejor los ataques. Cuando está presente en pastos, aparecen rodales amarillentos de hierba muerta donde hay mayor concentración de larvas (Coca, 2009). Los adultos se alimentan de hojas de árboles, arbustos y cultivos herbáceos, incluso puede dañar algunas flores, pero sus daños en plantaciones truferas son poco relevantes.

Como método de control general para todas estas larvas que se desarrollan bajo el suelo, con el laboreo se consigue la exposición de las mismas a predadores, así como la dificultad en la puesta, aunque estos trabajos deben ser compatibles con la fase de plantación en la que se encuentre.

Los coleópteros elatéridos, cuyas larvas son denominadas comúnmente gusanos de alambre, son otros de los artrópodos identificados en plantaciones truferas causantes de daños en raíz. Las larvas son delgadas, largas, cilíndricas y un poco aplanadas. Son de color amarillo, brillantes y cuentan con tres pares de patas cortas muy poco desarrolladas. Son muy frecuentes en otros cultivos, como los viñedos. La larva es muy sensible a la sequedad y se desplaza a lo largo del perfil del suelo en función de los niveles de humedad, la temperatura y época del año, buscando siempre humedades elevadas (Soria Carreras y Soria Ruiz-Ogarrio, 2018). Por este motivo, las plantaciones truferas con sistemas de riego son más sensibles al ataque de estos insectos. Los principales daños son producidos por las larvas, que se alimentan de raíces de las plantas. Los adultos vuelan muy poco, y preferiblemente por la noche. Se alimentan de hojas, sin causar daños mayores en plantaciones. Son fácilmente identificables por el mecanismo de “click” que poseen provocado por una espina en el protórax que puede encajarse en la muesca correspondiente del mesotórax, produciendo un movimiento violento que puede hacer que el escarabajo rebote en el aire (Evans, 1972; Ribak *et al.*, 2013).

Las larvas del bupréstido *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1758), también conocido como “gusano cabezudo” (Fig. 1.26) producen daños al excavar galerías desde las raíces en dirección ascendente hasta el cuello provocando un debilitamiento de la planta progresivo, e incluso pueden acabar matando al árbol (Garrido Vivas, 1984).



Figura 1.26.- Larvas del bupréstido *Capnodis tenebrionis*.

También provocan daños en raíces los topillos *Microtus duodecimcostatus* de (Seys-Longchamps, 1839) y *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) y el ratón de campo *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1.27). Estos roedores provocan heridas en el cuello de la raíz, causando la muerte de la planta. Sin embargo, juegan un importante papel en la dispersión de las esporas (Frank *et al.*, 2008).



Figura 1.27.- Topillo capturado en una plantación trufera (Izquierda). Daños ocasionados por estos mamíferos, seccionando por completo el pie afectado (Derecha).

2.2.2.- Enfermedades

El hongo ascomiceto *Rosellinia necatrix* Berl ex. Prill y el basidiomiceto *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm (Fig. 1.28) son causantes de podredumbres radicales blancas en el sistema radicular y en el cuello de la raíz en cientos de especies (Baumgartner *et al.*, 2011; Guillaumin y Legrand, 2013). Normalmente el origen del problema reside nuevamente en el cultivo precedente, y está asociado a un exceso de agua en la plantación, habitualmente debido a una capa freática superficial (Morrison, 1976; Ayres y Boddy, 1986). En este caso, una medida de control reside en el descenso de la humedad en el suelo, aunque no existen medidas curativas

eficientes y definitivas. El empleo de *Trichoderma harzianum* Rifai está en la actualidad aceptado para *Armillaria* en forestales (MAPA, 2018. (<https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25924.pdf>), y se ha mostrado efectivo para al control de *Armillaria* en condiciones controladas en laboratorio (Solís, 2017).

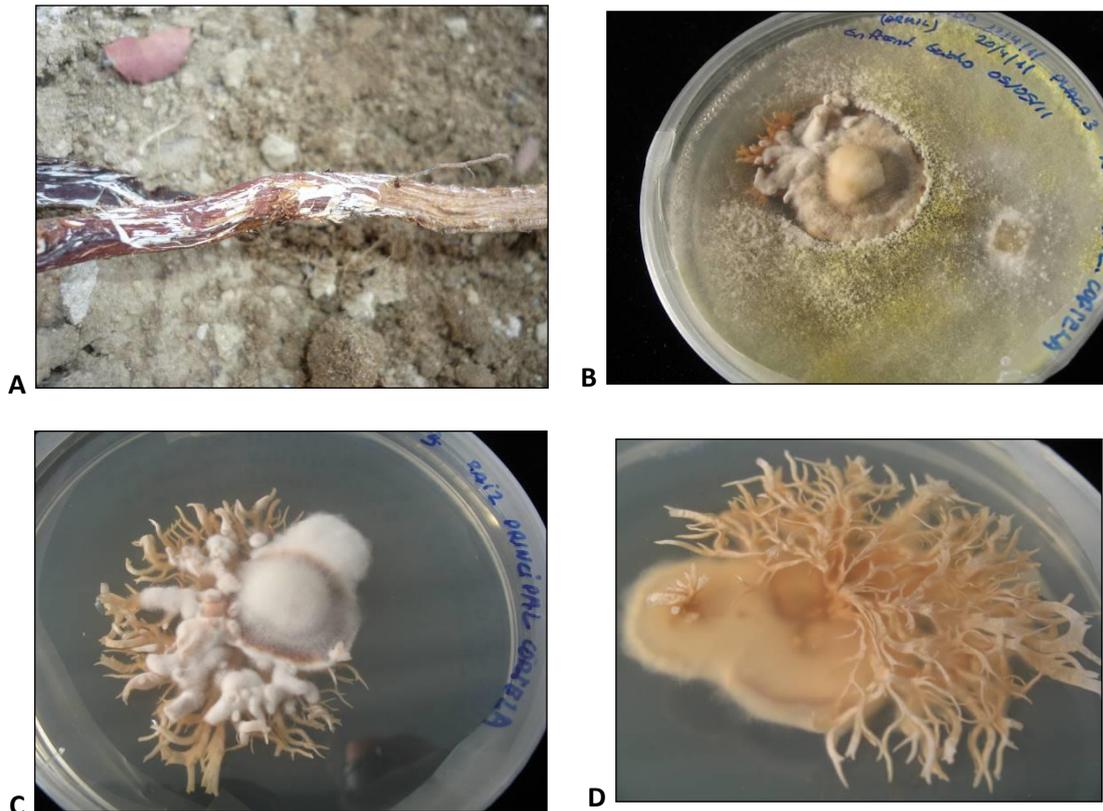


Figura 1.28.- Trabajos realizados con *Armillaria mellea* en el transcurso de esta tesis doctoral. Rizomorfos observables a simple vista en raíces de plantas de campo afectadas por este hongo (A). Enfrentamiento *in vitro* de *Armillaria* con *Trichoderma harzianum* (B). Cultivo *in vitro* de *Armillaria* (C, D).

Sin embargo, en plantaciones su control es complicado, ya que *A. mellea* puede permanecer latente por debajo de los 50cm de profundidad (Morrison, 1976), donde el tratamiento es complejo. Por otra parte, en las parcelas afectadas normalmente se manifiestan focos de infección, por lo que se recomienda evitar el laboreo con la intención de no propagar el hongo a plantas sanas, o incluso a otras parcelas no afectadas a través de los aperos de labranza.

Un problema extremadamente grave en las dehesas de Andalucía y Extremadura (Sánchez *et al.*, 2002) y todavía no detectado en plantaciones truferas es el Oomiceto *Phytophthora cinnamomi* De Bary. Fue detectado en prospecciones realizadas en Andalucía, Extremadura y Castilla La Mancha en encinares y alcornoques, tanto en el suelo como en raíces absorbentes de árboles afectados por la “seca”, grave enfermedad extendida en las dehesas españolas

(Brasier, 1992; Brasier *et al*, 1993; Cobos *et al*, 1993; Soria *et al.*, 1997). Se manifiesta cuando la planta ha sufrido estrés hídrico en presencia de este organismo. Es capaz de sobrevivir hasta 6 años en suelos (Zebtmeyer y Mircetich, 1966), y la humedad es un factor clave en el establecimiento, dispersión y longevidad de *P. cinnamomi*, necesitando de un ambiente húmedo, tanto para la formación de esporangios como para la movilidad de las zoosporas (Hardham, 2005).

Otra especie de este género, *Phytophthora ramorum*, ha demostrado ser infectiva bajo condiciones controladas en *Quercus* (Moralejo *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha demostrado su presencia en *Quercus* en plantaciones truferas.

2.3.- Daños producidos por fauna silvestre

En caso de darse algunos daños sospechosos de haber sido producidos por la fauna silvestre, para poder identificar la especie causante es necesario tener conocimiento de las especies que pueden encontrarse en la zona. Estos animales, en consecuencia directa de sus costumbres y hábitos de vida, con el fin de buscar alimento, atravesar un lugar como zona de paso o cualquier necesidad biológica del individuo o grupo, pueden causar daños en plantaciones truferas. Éstos suelen ser:

- Rotura de vallados
- Escarbaderos debajo de la valla
- Hoyos en las proximidades del punto donde se encuentra la trufa
- Extracción de los carpóforos para el alimento
- Ramoneo de las hojas o tallos de las plantas truferas

Los daños producidos por animales silvestres registrados tanto en las plantaciones truferas como las trufas suelen ser causados por las siguientes especies principalmente, aunque no se debe descartar otras de las cuales no se tenga constancia o cuya presencia no haya podido ser constatada:

- Conejo (*Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758))
- Cabra Montés (*Capra pirenaica* (Schniz,1838))
- Corzo (*Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758))
- Jabalí (*Sus scrofa* (Linnaeus,1758))
- Ciervo (*Cervus elaphus* (Linnaeus, 1758))
- Tejón (*Meles meles* (Linnaeus, 1758))

Debido a la descontrolada proliferación del jabalí en España, cada vez son mayores los problemas generados por esta especie, principalmente en truferas silvestres, obligando a los truficultores y gestores a vallar sus plantaciones al iniciar la plantación. Estos mamíferos hozan la tierra dejando las raíces al descubierto, provocando una gran pérdida de masa radical (Fig. 1.29).

Su presencia puede ser detectada fundamentalmente por las huellas, excrementos, y restos que pueden dejar a su paso. Presenta una huella característica con el marcado de pezuñas grandes delante y la impresión de las huellas secundarias, rascadas en los troncos de los árboles producidas por sus colmillos. Son frecuentes también las manchas de barro en troncos provocadas por el rascado tras los baños de barro, o la remoción del suelo con sus hocicos levantando la parte superficial del suelo en busca de alimento.



Figura 1.29.- Daños provocados por jabalí (Izquierda) y por tejón (Derecha) en una plantación trufera.

Los daños provocados por el tejón (Fig. 1.29) derivan de la alimentación de trufas. En ocasiones se pueden confundir con los provocados por el jabalí, aunque los tejones no remueven la tierra. Para evitarlos, se aconseja la colocación de vallas en las plantaciones.

Las cabras y los corzos son dos mamíferos bastante frecuentes en determinadas zonas truferas de Aragón. En el caso de la cabra, ramonean las hojas de los pies simbiotes, sin ser excesivamente selectivos en la dureza del follaje ni en la especie vegetal (Fig. 1.30). Es común la presencia de daños en la corteza de los árboles provocados por la cornamenta.

En el caso de los corzos, son más selectivos en cuanto a la especie vegetal, y en cuanto a la dureza de las hojas, prefiriendo los brotes tiernos (Fig. 1.30). En su caso, debido a sus características morfológicas, el vallado no es impedimento, siendo capaces de saltarlo sin más dificultad.



Figura 1.30.- Daños provocados por cabras en encina (Izquierda) y corzos en quejigo (Derecha). A la izquierda se puede observar la completa defoliación, así como el descortezado del tronco asociado al roce de la cornamenta. A la derecha se puede observar la presión ejercida sobre el único quejigo de una plantación de carrascas de cuatro años.

Estos daños suelen agravarse cuando la planta es joven y se rompe el eje de crecimiento. Además de los daños producidos por la alimentación, los corzos en primavera, y debido a la salida de las cuernas, se rascan en los árboles produciendo heridas en las plantas y rompiendo los brotes.

La presencia de conejos en plantaciones no entraña grandes problemas, excepto cuando se produce una explosión demográfica. En estos casos suelen roer la corteza del tronco por encima del nivel del suelo (Fig. 1.31) pudiendo ocasionar la muerte del árbol al producir el anillado total del tronco. Se recomienda en aquellas zonas con abundancia de conejos el uso de protectores de tronco (Fig. 1.31). Éstos tienen que tener una altura superior a la longitud del conejo y ser lo suficientemente rígidos para que no los doble. Es oportuno aporcar tierra para evitar que puedan levantarlo.



Figura 1.31.- Daños provocados por conejos en una plantación trufera (Izquierda). Protector colocado en una encina para evitar los daños producidos por conejos (Derecha).

También pueden provocar daños en los sistemas de riego, principalmente en los años de intensas sequías. En estos casos, tienden a perforar las mangueras cuando se encuentran superficiales para obtener agua, provocando una pérdida de agua y de presión en el sistema.

2.4.- Daños abióticos

En comparación con otras especies forestales, las quercíneas son plantas robustas que aguantan bien el calor estival, sequías prolongadas, heladas y una alta exposición al sol, aunque pueden aparecer en años puntuales, daños por temperaturas extremas.

Las heladas primaverales tardías afectan con gran asiduidad en climas continentales a las plantaciones de truferas. El frío provoca alteraciones fisiológicas en las plantas, que reducen su crecimiento. Si es intenso, puede ocasionar lesiones en las membranas celulares y estrés hídrico en los tejidos. En las diferentes especies de *Quercus* se trata de un síntoma muy característico, fácil de diferenciar de otros daños, en el que la hoja comienza a secarse desde el borde hacia la parte interior (Fig. 1.32), terminando en un marchitamiento y posterior ennegrecimiento del brote, llegando en algunas ocasiones a un decaimiento general de la planta cuando la helada es muy acusada.



Figura 1.32.- Riego helado (Izquierda). Efectos de una helada intensa tras haber brotado una encina (Derecha).

En planta adulta, los pies afectados sufren un estrés puntual, a causa del cual pueden padecer un debilitamiento que será revertido a corto-medio plazo. Sin embargo, en planta de vivero los daños son irreversibles.

Es aconsejable que las plantas destinadas a repoblaciones de zonas de interior con clima continental, estén cultivadas también en vivero del interior o al menos que hayan pasado un periodo previo de aclimatación en un vivero con características parecidas a la zona de repoblación.

El granizo es otro agente abiótico que en función de la intensidad y tamaño del mismo puede ocasionar daños sobre las plantas truferas (Fig. 1.33), pudiendo verse afectados pocos ejemplares o llegar a arrasar hectáreas de superficie.

La evidencia más clara del efecto del granizo se puede ver en las hojas (que por el efecto del impacto estarán en el suelo), y en la presencia de heridas en distintas partes del árbol. El mayor daño se produce en los tejidos juveniles, siendo afectado básicamente el follaje, pero también se pueden apreciar lesiones circulares en la corteza, producto del impacto.

Estos daños ocasionan pérdidas de crecimiento, producto de la defoliación, y las heridas en ramas y tronco originadas por los golpes, que tardarán varios años en cicatrizar. De manera indirecta las heridas causadas por el granizo pueden ser vías de entrada de diversos agentes patógenos. Y estos daños a su vez afectan a la vitalidad de los árboles, creando condiciones óptimas para el ataque de plagas y enfermedades secundarias.

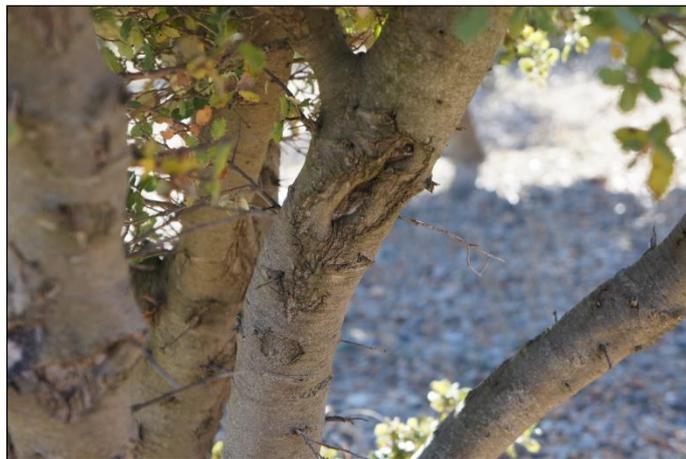


Figura 1.33.- Cicatrices en rama de encina producidas por granizo.

La nieve puede llegar a ocasionar daños severos en plantaciones truferas. El contratiempo más directo es el parón en la recolección de trufa. Al haber acumulación de nieve en el suelo, y posteriormente un exceso de agua en la parcela, que impide la búsqueda de trufas, puede perderse la cosecha de varias semanas. Por otra parte, se pueden llegar a producir intensos daños en la parte aérea de los árboles (principalmente encinas) debido a la acumulación de nieve, causando la rotura de ramas (Fig. 1.34) de diferentes grosores y en árboles jóvenes incluso del tronco.



Figura 1.34.- Rama rota a causa de una intensa nevada acontecida en la Comarca Gúdar-Javalambre (Teruel).

La correcta elección del terreno, así como de la especie vegetal y un contenedor adecuado son criterios imprescindibles para el establecimiento de una plantación trufera exitosa. Un error en cualquiera de estos factores puede derivar en problemas de establecimiento vegetal (Fig. 1.35), que implican:

- Clorosis
- Escaso desarrollo radical
- Microfilia
- Heladas
- Crecimiento deficiente de las plantas



Figura 1.35.- Pie de encina trufera con severos daños provocados por falta de adaptación.

Esto conlleva en muchos casos la aparición de algunos problemas fitopatológicos relacionados con parásitos secundarios, principalmente coleópteros cerambícidos, capaces de afectar a plantas debilitadas. Según Zobel y Talbert (1988), en caso de existir problemas con la adaptación, algunos de los árboles pueden morir de inmediato, pero el resto crecerá normalmente hasta que entren en un periodo de desequilibrio fisiológico extremo causado por

fluctuaciones ambientales severas o ataque de plagas. En ese momento muchos de los árboles desarrollarán una desecación descendente en el tallo principal y en las ramas e incluso pueden llegar a morir, y solo aquellos que están bien adaptados sobrevivirán y crecerán normalmente.

Aunque es cierto que la truficultura no requiere de suelos ricos para su cultivo, hay unos parámetros mínimos que deben de cumplirse, y no solamente en cuanto a propiedades físico-químicas, sino también en cuanto a profundidad de suelo. Son muchos los truficultores que optan por la truficultura al no obtener rentabilidad en sus cultivos de cereal de secano, pero este cambio no es siempre sinónimo de éxito. En ocasiones el suelo es tan somero y pobre que el problema no reside en la falta de fructificación del hongo, sino simplemente en la supervivencia del pie simbiote. En estos casos es generalizado un decaimiento y clorosis en la parcela (o en ocasiones en los rodales en los que existe roca madre más superficial), y es frecuente la aparición de plagas secundarias, como cerambícidos o lepidópteros perforadores. Estos organismos muchas veces llevan asociados daños originados por el pájaros picapinos *Dendrocopos major* (Linnaeus, 1758). Estas aves se ven atraídas por las larvas de estos insectos, y con el pico realizan pequeñas melladuras lo suficientemente profundas para alcanzar los insectos y larvas refugiados en el árbol.

La mejor de las soluciones a este problema es realizar un análisis físico-químico del terreno antes de plantar, y escoger la especie que más se adecue al territorio. Si los problemas se han detectado después de realizar la plantación, es necesario adaptar la poda a los recursos, realizando una poda intensiva.

La correcta elección de la especie de árbol simbiote es clave para el éxito de la plantación. Este es precisamente otro de los problemas más frecuentes de adaptación de planta al medio. El empleo de plantas alóctonas puede producir enanismo de la planta, clorosis generalizada, o microfilia (Fig. 1.36).



Figura 1.36.- Planta con problemas de adaptación, en la que se puede observar enanismo y clorosis.

Por último, la elección de un contenedor adecuado al cultivo es una decisión importante. Los contenedores forestales tipo Full-pot® son los más empleados en la producción de planta micorrizada en España. Sin embargo, en los años 80, cuando comenzara la producción de planta micorrizada, se importó el denominado “Melfert”. Se trata de una tela que contiene el sustrato necesario para producir planta micorrizada con trufa negra. Se trata de un método muy cómodo de hacer en vivero y de transportar y plantar en campo, ya que no se desmorona el sustrato, tal y como puede pasar con otros contenedores. Sin embargo, cuenta con dos inconvenientes a tener en cuenta. El primero de ellos es que las raíces pueden crecer en forma de espiral, provocando el estrangulamiento de la planta a medio plazo. El segundo de los hándicaps es que, si no se realiza un manejo adecuado en campo, la tela puede no degradarse (Fig. 1.37), impidiendo la salida de las raíces del propio contenedor. Esto provoca un desarrollo de raíces gruesas de anclaje, y una carencia de raíces secundarias, lo que deriva en la muerte de la planta por déficit hídrico y de nutrición.



Figura 1.37.- Consecuencia del empleo de un contenedor no adecuado para la gestión de la plantación. Sintomatología de la planta (Izquierda). Presencia del Melfert intacto tras seis años de cultivo (Derecha).

2.5.- Hongos ectomicorrícicos competidores

El cultivo de trufa negra es un aprovechamiento a medio-largo plazo. Cuando se comienza una plantación trufera el truficultor debe esperar como media siete años antes de la recolección de los primeros carpóforos, y este periodo se alarga hasta que se consigue obtener una producción constante y plena, estado al que no suelen contribuir más del 50% de los árboles instalados en la misma (Sáez y De Miguel, 2008).

La mayoría de factores que pueden influir en la producción se conocen o están en fase de estudio: textura, pH, altitud, pendiente, poda o calidad de planta micorrizada entre otros (Callot, 1999; Hall *et al.*, 2007; Reyna *et al.*, 2012; Morcillo *et al.*, 2015). Aun así, algunas

plantaciones tardan 10-15 años en producir, y otras nunca llegan a hacerlo. En algunos casos, los árboles no tienen ectomicorrizas de trufa negra en sus raíces. El problema puede residir en la calidad de los plantones micorrizados, que han podido ser contaminados, bien por especies del género *Tuber* (*T. brumale*, *T. aestivum*, o *T. borchii*), o bien por hongos contaminantes de vivero como *S. brunnea*, *P. constellatio*, *Thelephora terrestris* Ehrh. o *Laccaria* Berk. & Broome (Meotto y Carraturo, 1988; Bencivenga *et al.*, 1995). El origen de estas contaminaciones puede residir en el empleo accidental de trufas diferentes a *T. melanosporum*, contaminación del propio invernadero por hongos típicos de estas instalaciones, o por una incorrecta conservación y manipulación de la planta (Chevalier *et al.*, 1982; Hall *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2012).

Aunque las plantas que salen del vivero con niveles más bajos de micorrización son más vulnerables al desplazamiento por otros hongos competidores en campo (Iotti *et al.*, 2012), toda planta una vez establecida en la parcela sufre una importante competencia por otros hongos presentes en el suelo, que puede llegar a comprometer el mantenimiento de las micorrizas de *T. melanosporum*, principalmente en las primeras etapas de la plantación, cuando la especie introducida es más vulnerable a ser desplazada (Zambonelli *et al.*, 2012).

Aun así, hasta en el material de plantación de mayor calidad, queda siempre un porcentaje de ápices no micorrizados que son susceptibles de ser ocupados por estos hongos competidores. Su presencia es inevitable, ya que son parte del ecosistema trufero y su actividad puede ser hasta determinante para la producción de carpóforos (De Miguel *et al.*, 2014).

El único signo observable a simple vista de la correcta evolución de una plantación es la presencia de quemados alrededor de los pies simbiotes, y aun así es necesario tener en cuenta que otros hongos como *Trichophaea woolhopeia* (Cooke & W. Phillips) Boud., *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan, o *Geastrum* sp. (Pers.) son capaces de formar quemados (Giraud, 1988; Verlhac *et al.*, 1990; Reyna, 1999; Reyna y De Miguel, 2007). Por ello, la única forma de asegurarse de la correcta evolución de una plantación es el análisis de las micorrizas de los pies que la conforman.

Existen especies que se pueden encontrar frecuentemente, y que forman parte del cortejo micorrícico de *T. melanosporum*, como son *T. woolhopeia*, *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, o *Quercirrhiza squamosa* Palfner & Agerer, entre otras (Fig. 1.38). Hoy en día se desconoce el papel que ejercen estas especies en la fructificación de la trufa negra. Hay diversos estudios (De Román y De Miguel, 2001; Reyna *et al.*, 2006; Rubini *et al.*, 2010; De Miguel *et al.*, 2014) que hablan de la frecuente identificación de estas especies en campo, aunque todavía no se han relacionado con el ciclo biológico de la trufa negra.

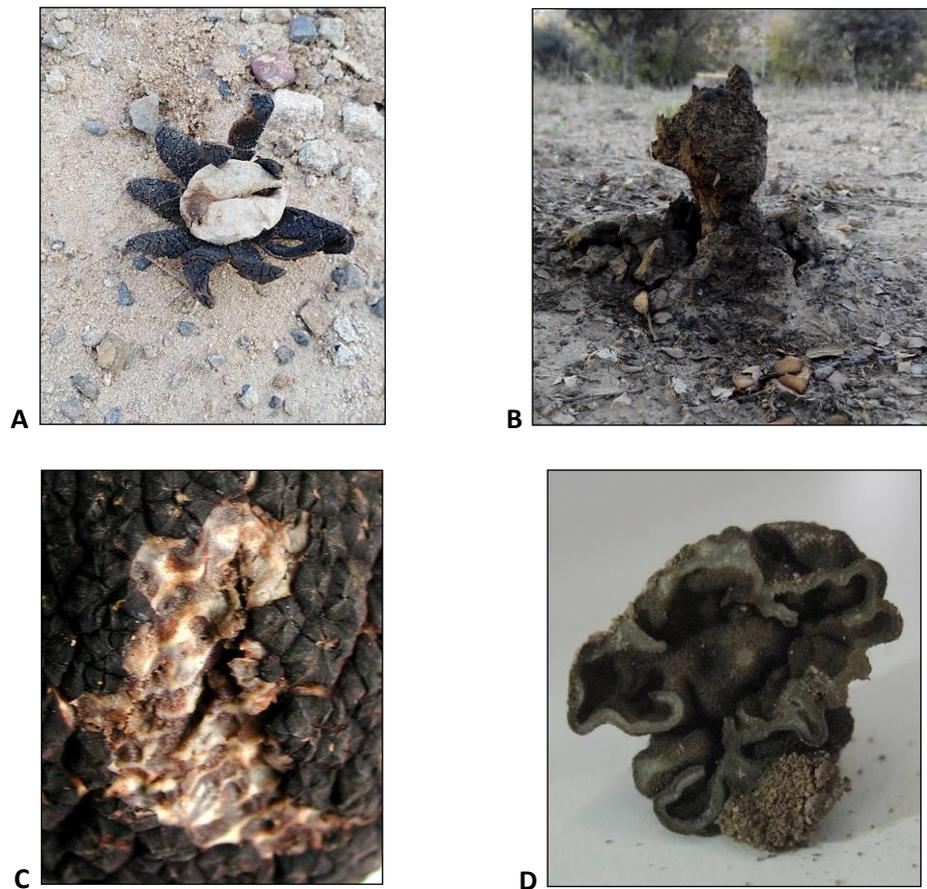


Figura 1.38.- Diferentes hongos presentes frecuentemente en plantaciones truferas. Estrella de tierra, *Geastrum* sp. (A). *Pisolithus arhizus* (B). Detalle de peridio descortezado en un carpóforo de *Tuber brumale* (C). Carpóforo de *Genea* (D).

En esta última década se ha generalizado la realización de los “nidos”, “pozos” o “aportes”. Consiste en la aportación de materia orgánica al suelo, la mayor parte de veces acompañada de trufa. Es imprescindible la confirmación de la especie de trufa a introducir cuando se llevan a cabo estas prácticas. Una trufa puede contener 7×10^7 esporas por gramo (Bernal, 2008), por lo que la adición de una trufa de una especie no deseada en el inóculo de los pozos puede contaminar gran parte de la plantación. De este modo, la introducción de *T. brumale* o *T. aestivum* por equivocación puede conllevar la contaminación irreversible de la parcela. También las propias turbas que se emplean podrían tener propágulos infectivos de competidores.

2.6.- Otros problemas en plantaciones truferas

Existen otros posibles contratiempos que se pueden dar en plantaciones truferas relacionadas con organismos que suelen formar parte de la fauna habitual, pero que en determinadas condiciones pueden causar problemas.

En momentos puntuales pueden llegar a causar problemas los caracoles (Fig. 1.39), ya que pueden acumularse en las bailarinas del riego, impidiendo la salida de agua, y requiriendo el repaso de todos los microaspersores antes de iniciar el riego, con la pérdida de tiempo que conlleva. Su acumulación en troncos es casi anecdótica, y no suele causar daños relevantes. Del mismo modo, las bailarinas de riego son refugio para las arañas, por lo que es necesaria la limpieza de las mismas al inicio de la temporada de riego.



Figura 1.39.- Proliferación de caracoles en una plantación trufera.

La presencia de la avispa *Polistis gallicus* (Linnaeus, 1761) en los protectores (Fig. 1.40) es muy frecuente. En ellos encuentran refugio. También es común que las aves, tratando de cazarlos, acaben cayendo dentro de los protectores, de los que no podrán salir. Si la planta es joven, esto causa su aplastamiento.



Figura 1.40.- Avispero en el interior de un protector.

3.- Plagas asociadas a carpóforos

Como complemento a este estudio, se han analizado los problemas que habitualmente suelen aparecer en los carpóforos.

Las trufas son hongos que se recolectan cuando han alcanzado su madurez, por lo que su vida útil se reduce considerablemente (Rivera *et al.*, 2011). Existen además agentes bióticos y abióticos que contribuyen al deterioro de las mismas, acortando aún más su vida comercial o incluso imposibilitando su presencia en los mercados.

Rivera (2009) y Marco (2013) destacan entre estos factores abióticos la senescencia, la congelación y la deshidratación, y entre los agentes bióticos los principales causantes del deterioro son los microorganismos y los artrópodos y mamíferos.

Todos estos factores inducen cambios sensoriales en los carpóforos, reduciendo su vida útil y afectando a su comercialización. En cuanto a los factores abióticos, la congelación afecta a la textura de las trufas, generando trufas blandas, no turgentes y elásticas (Mencarelli *et al.*, 1997). Este proceso de congelación se suele dar en parcelas en las que la producción de trufas es superficial, principalmente debido una gestión de no laboreo, y se intensifican cuando se producen heladas dilatadas en el tiempo. En épocas de déficit hídrico es frecuente la recolección de carpóforos deshidratados, causando una pérdida de peso, así como de la calidad organoléptica y del valor comercial, tal y como afirman Rivera *et al.* (2010b). En este trabajo efectuado demostraron que trufas de verano, tras 2 semanas de conservación en aire, tuvieron unas pérdidas de peso del 5,8%.

Estos problemas debidos a daños abióticos se deben de trabajar en el campo, tratando de disminuir la cantidad de carpóforos obtenidos en superficie, y por tanto, más expuestos a variaciones de temperatura y humedad, y realizando aportes hídricos. Sin embargo, el deterioro biótico es preciso detenerlo o ralentizarlo desde el mismo momento de la recolección.

El crecimiento microbiano junto con la pérdida de aroma han sido señalados como los principales causantes del deterioro de las trufas (Massini y Landucci, 1988, Rivera *et al.*, 2011a). De acuerdo a los trabajos realizados por Rivera *et al.* (2010a) este deterioro microbiano se ve favorecido por tratarse de un hongo hipogeo con una importante población microbiana, por la propia estructura irregular del peridio de la trufa, por los traumatismos ocasionados a los largo del desarrollo de los cuerpos fructíferos, y por tratarse de un fruto maduro, con elevado contenido hídrico y nutrientes asimilables, y por lo tanto mucho más susceptible a la alteración biótica. En este mismo trabajo demostraron que en *T. aestivum* y *T. melanosporum* los grupos microbianos cultivables predominantes asociados a las mismas son, el G^o *Pseudomonas*, la F^a *Enterobacteriaceae* y la micobiota, en este orden, independientemente de la especie y de la época de recolección.

La necesidad de conservación de la trufa está focalizando los estudios hacia la búsqueda del mejor método de preservación. Hasta el momento se han obtenido resultados positivos con el empleo de técnicas de descontaminación junto con la utilización de atmósferas modificadas (Rivera *et al.*, 2011a), o mediante radiaciones ionizantes gamma y haz de electrones (Rivera *et al.*, 2011b) prolongando la vida útil de la trufa negra hasta 28 días. .

Los insectos y mamíferos producen daños irreversibles en los carpóforos. Sin embargo tienen un doble papel. Por una parte se comportan como plaga, alimentándose de trufa, y por otra parte diseminan las esporas. El escarabajo de la trufa (*L. cinnamomeus*) y las moscas de la trufa (*Suillia* sp. (Robineau-Desvoidy , 1830)) son los dos principales problemas con los que nos encontramos en los carpóforos. Su presencia en trufas está comprobada desde principios del siglo XX. Pradel (1914) y Arzone (1971) exponían los problemas generados por estos artrópodos, pero los daños causados por estas especies están causando cada vez más preocupación entre los truficultores españoles. En primer lugar debido a la falta de higiene y a la depreciación del producto, y en segundo por las pérdidas económicas, en peso y calidad, que esto suele suponer al productor (Barriuso *et al.*, 2012).

Suillia (Fig. 1.41) ha sido detectada tanto en carpóforos de *T. melanosporum* como de *T. aestivum*. Sus larvas, y por tanto sus galerías suelen ser de menor tamaño, pero suele haber una gran cantidad alimentándose de una misma trufa, llegando a ocasionar la disminución de hasta el 40% del peso fresco del carpóforo. La pérdida de calidad es inminente, ya que además se produce una degradación por putrefacción y enzimática muy rápida de toda la gleba (Rivera, 2010b).

Se han observado capturas de la mosca de la trufa en las trampas para *L. cinnamomeus* empleadas en los trabajos llevados a cabo en el capítulo 4, aunque estas capturas aumentan considerablemente al emplear el mosquero Hemitrap® 2180 (Probodelt, España).



Figura 1.41.- Adulto de la mosca de la trufa.

Leiodes cinnamomeus es una especie estrictamente ligada a *Tuber*, principalmente *T. melanosporum* (Pacioni, 1991). La proliferación de este escarabajo en las plantaciones truferas es muy alta, ocasionando daños muy severos (Fig. 1.42) en plantaciones, y suscitando la preocupación de truficultores y gestores. Por este motivo se ha profundizado en su biología y ecología como base para su control en el capítulo 4 de esta tesis.

Se está trabajando en la actualidad con el trapeo masivo con atrayentes alimenticios como método de control. Por el momento, los resultados son esperanzadores, alcanzándose una reducción de más del 60% de trufas dañadas (Navarro-Llopis *et al.*, 2019).

Paralelamente pueden emplearse otras medidas culturales para disminuir las poblaciones de estos insectos. Un laboreo superficial en la plantación que impida la formación de trufas en los primeros 10 cm de terreno, así como la recolección de otras trufas presentes en la plantación para evitar la proliferación de estos insectos son dos medidas aconsejadas.



Figura 1.42.- Trufa negra atacada por *Leiodes cinnamomeus*. Pueden observarse las galerías y refugio, así como las propias larvas en su interior.

Sin embargo, estos no son los únicos insectos capaces de ocasionar daños en carpóforos. En trabajos realizados por este equipo se han detectado dos dípteros frecuentes en *T. melanosporum* y *T. aestivum*. Se trata de *Megaselia sp.* Rondani (1856) y *Drosophila funebris* (Fabricius, 1787) (Castel, 2012). Han sido detectadas con anterioridad como plaga de setas cultivadas (Gnaneswaran y Wijayagunesakara, 1999). Las larvas son de pequeño tamaño (no más de 3mm) pero son muy abundantes cuando un carpóforo está parasitado.

Se han detectado otros insectos en cuerpos fructíferos, como son *Pleurophorus sp.* (Mulsant, 1842) o el miriápodo de la clase *Diplopoda* *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758). Suelen ser especies detritívoras, y coprófagas, por lo que su presencia en carpóforos se debe a la presencia previa de galerías de otros parásitos (Barriuso *et al.*, 2012).

Los topillos (*M. duodecimcostatus* y *M. arvalis*) tal y como se ha comentado con anterioridad, no solamente son capaces de ocasionar daños en las plantas truferas royendo la corteza, anillando los pies jóvenes o incluso llegando a seccionarlas, sino también se alimentan de las trufas, produciendo una disminución de la cosecha, y devaluando el producto por presentar marcas.

Para el control de estas especies es frecuente y útil la colocación de pértigas para rapaces y el laboreo cruzado de las plantaciones para levantar las madrigueras. También se aconseja eliminar la maleza para evitar el refugio que ésta les proporciona.

En el propio momento de la búsqueda y recolección de trufas pueden producirse lesiones, bien producidas por las garras del perro al rastrear y escarbar para encontrar los carpóforos, o bien por el propio recolector al romper los cuerpos fructíferos con el machete. Estas lesiones devalúan el precio de las trufas en sí, y además aceleran la actividad metabólica y el deterioro de los carpóforos.

Cabe destacar en general la gran cantidad de agentes nocivos identificados en plantaciones truferas. Algunos de ellos son muy frecuentes, aunque los daños ocasionados son anecdóticos. Sin embargo, en otros casos la incidencia es baja, pero el daño ocasionado cuando se produce el ataque es muy intenso. Del mismo modo este compendio de plagas deja al descubierto la necesidad de investigaciones más exhaustivas de determinadas plagas y enfermedades debido al desconocimiento de su biología, como es el caso de *L. cinnamomeus*, de su comportamiento, como por ejemplo *P. constellatio* e incluso de su origen, como es el caso de las tumoraciones en ramas y tronco de encina.

Capítulo 2

Biología de *Pulvinula constellatio*
(Berk. & Broome) Boud viveros de
producción de planta micorrizada



INTRODUCCIÓN

La producción controlada de planta micorrizada es uno de los pilares más importantes sobre los que se sustenta la truficultura hoy en día, junto a la elección de suelos y climas apropiados para este propósito. Un error en cualquiera de estos parámetros puede conllevar el fracaso de la plantación, con el agravante de que al tratarse de un cultivo de medio a largo plazo, el truficultor no será consciente de este hecho hasta pasados 7 años en el mejor de los casos, y que este periodo se alarga hasta que alcanza una producción constante, estado al que no suelen llegar más del 50% de árboles (Sáez y De Miguel, 2008).

La micorrización controlada de plantas imita en vivero lo que sucede de forma espontánea en la naturaleza. Consiste en poner en contacto las raicillas de la planta con las esporas o micelio del hongo en condiciones ambientales favorables para facilitar la formación de las micorrizas (Palazón y Barriuso, 2012).

Hoy en día en España hay decenas de viveros especializados en producir plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* Vittad. (Cocina *et al.*, 2013). La calidad de las plantas de trufa producidas en los mismos es un requisito previo esencial para el éxito del cultivo de la trufa. La calidad de la planta micorrizada está directamente relacionada con varios parámetros (Andrés-Alpuente *et al.*, 2014), como son:

- Planta de calidad forestal (descrita en el Real Decreto 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción).
- Cantidad de micorrizas de *T. melanosporum*.
- Cantidad de colonización micorrícica por otros hongos competidores.

Uno de los mayores problemas en este sector, y que compromete esta calidad en las plantas truferas, es la presencia de hongos competidores. La planta de vivero debe presentar un grado óptimo de micorrización por *T. melanosporum* y niveles bajos de otros tipos de micorrizas competidoras, que pueden aparecer inesperadamente causando grandes pérdidas en lotes completos. Un alto nivel de colonización de competidores micorrícicos limitará la colonización por *T. melanosporum* y, por lo tanto, la calidad de la planta (Di Massimo, 1996; Palazón y Barriuso, 2012).

El hongo *Sphaerospora brunnea* (Alb. & Schwein.) Svrček & Kubička (Fig. 2.1) se puede considerar como la especie contaminante más común en la producción de plantas micorrizadas con trufa (Sánchez *et al.*, 2014a), motivo por el cual ha sido estudiada en detalle (Di Massimo *et al.*, 1996; García Montero *et al.*, 1997; García Montero *et al.*, 2008; Sánchez 2012).



Figura 2.1.- Carpóforos de *Sphaerospora brunnea* en la superficie de un contenedor de planta micorrizada con *Tuber melanosporum*.

Sin embargo, en los diferentes controles de calidad de planta micorrizada pueden detectarse otros hongos ectomicorrícicos, como *Trichophaea woolhopeia* (Cooke y W. Phillips) Boud., *Hebeloma* Fr.) P. Kumm, *Thelephora terrestris* Ehrh. o *Laccaria* Berk. & Broome, entre otros (Zambonelli *et al.*, 2000; Garcia-Montero *et al.*, 2008). Su presencia la mayoría de ocasiones está relacionada con una incorrecta gestión de los sustratos y la selección de carpóforos de destrío como inóculo.

Otra especie competidora, que se menciona con frecuencia en la bibliografía, es *Pulvinula constellatio* (Berk. & Broome) Boud. (Fig. 2.2). Esta especie ha causado graves pérdidas de calidad de planta en otros países, Italia principalmente (Amicucci *et al.*, 2001), pero hasta el presente trabajo no había sido identificada en ningún vivero español.



Figura 2.2.- Carpóforos anaranjados en los contenedores Full Pot® donde se cultiva planta inoculada con *Tuber melanosporum* y *Tuber aestivum* en el invernadero del CITA del Gobierno de Aragón.

Es un ascomiceto pezizal de la familia Pyronemataceae de distribución global, frecuentemente asociada a briofitos en zonas quemadas (Larsen, 1980). En el caso de los viveros de producción de planta micorrizada, se trata de un ambiente artificial en el que todo el material ha sido desinfectado, creando un espacio libre de hongos micorrícicos, en el que organismos pioneros encuentran un nicho óptimo para desarrollarse.

El papel de este tipo de hongos en nichos ecológicos vacíos es importante, siendo capaces de colonizar en un corto espacio temporal zonas que han sido fuertemente perturbadas (Smith y Read, 2009). Este tipo de hongos suele presentar una estrategia de reproducción “r”, lo que implica una elevada tasa de crecimiento. Son capaces de colonizar rápidamente un ambiente y alcanzar rápidamente su madurez formando cuerpos fructíferos en un corto periodo de tiempo.

Estos cuerpos fructíferos contribuyen a la rápida colonización de los ecosistemas. Tal y como describe Krøyer (2006) estructural y funcionalmente los hongos micorrícicos son formados por:

- 1.- Las micorrizas
- 2.- El micelio externo que se ramifica en el suelo a partir de las micorrizas
- 3.- Los esporocarpos
- 4.- El banco de esporas y otros propágulos infectivos presentes en el suelo

En el caso de hongos contaminantes de vivero, el tercer y cuarto puntos son clave para su reproducción, ya que son las estrategias más eficientes para su dispersión en ambientes controlados, y aquellos puntos donde se debe incidir para su control y erradicación.

El cultivo *in vitro* de *P. constellatio* puede ser determinante para conocer estas estrategias de reproducción y establecer un protocolo de trabajo para su erradicación en viveros. En trabajos anteriores llevados a cabo por el grupo de trabajo de truficultura del CITA del Gobierno de Aragón se trabajó con *S. brunnea in vitro* e *in vivo*, profundizando así en el manejo de este contaminante (Sánchez *et al.*, 2014a). Su proximidad taxonómica con *P. constellatio*, así como con otros Pezizales que crecen bien *in vitro*, permite sospechar que se podrían llevar a cabo estrategias similares para estudiar su biología y ecología de un modo controlado.

Por lo tanto, la aparición de *P. constellatio* por primera vez en viveros de producción de planta micorrizada españoles abre diferentes trabajos a desarrollar con la intención de conocer su comportamiento de cara al establecimiento de medidas de prevención y control.

OBJETIVOS

En este segundo capítulo se plantearon tres objetivos a alcanzar:

- La confirmación de la presencia de *Pulvinula constellatio* en viveros españoles de producción de planta micorrizada para truficultura.
- La observación de la evolución de este contaminante en el invernadero a lo largo de dos años.
- El aislamiento *in vitro* de este hongo como primer paso para estudiar su biología en condiciones controladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En noviembre de 2014 se detectaron por primera vez carpóforos que presentaban características morfológicas compatibles con el hongo micorrícico *P. constellatio* en las instalaciones del CITA del Gobierno de Aragón. A partir de este momento comienzan los trabajos de identificación morfológica y molecular del hongo, los esfuerzos para su cultivo *in vitro* en laboratorio y el seguimiento de la evolución del mismo en las instalaciones del invernadero.

1- Características de las plantas y del invernadero

El invernadero en el que aparecieron los carpóforos está dedicado a investigación sobre producción de plantones micorrizados con diferentes especies de trufas. Consta de una capilla de techo y paredes de cristal y está dividido en tres cuerpos separados por puertas correderas. El suelo es de cemento y gravilla. Existe ventilación lateral y cenital, y una dispersión de agua con microaspersores para disminuir la temperatura los meses estivales. La refrigeración tipo cooling que poseía estaba inutilizada, pero cada cuerpo conserva el ventilador del sistema, que contribuye a disminuir la temperatura en verano.

Cuando aparecieron los primeros cuerpos fructíferos, en el vivero había dos especies de trufas, *T. melanosporum* y *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng., inoculadas en dos especies arbóreas, encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) y quejigo (*Quercus faginea* Lam.). Había además planta sin inocular.

Cuando se detectaron los primeros cuerpos fructíferos en el invernadero, en su interior había (Figura 2.3):

- 519 plantas sembradas en 2013 (plantas de 3 años)
 - 117 de ellas inoculadas con *T. aestivum* (94 *Q. ilex* y 23 *Q. faginea*) en contenedores de 450cc y 650cc.
 - 265 plantas inoculadas con *T. melanosporum* (198 *Q. ilex* y 67 *Q. faginea*)
 - 137 plantas no inoculadas
- 378 plantas sembradas en 2014 (plantas de 2 años)
 - Todas ellas *Q. ilex* inoculadas con *T. melanosporum*
- 572 plantas sembradas en 2015 (plantas de 1 año)
 - Todas ellas *Q. ilex*, 449 inoculadas con *T. melanosporum*
 - 123 plantas no inoculadas



Figura 2.3.- Esquema de situación inicial en los tres cuerpos del invernadero. En el interior de cada caja se indica el número de plantas presentes.

Todas las plantas procedían de bellota certificada adquirida en 2013, 2014 o 2015, y fueron germinadas en vermiculita en enero de cada uno de estos tres años. Las plántulas fueron trasplantadas en abril a contenedores forestales de 450 cm³, momento en el cual los lotes a los que les correspondía se inocularon con trufa siguiendo el método de Palazón *et al.* (1999b). El sustrato utilizado para este procedimiento fue una mezcla compuesta por: tierra de parcelas agrícolas (38%p/p), vermiculita (10%p/p), perlita (2%p/p), arena (35%p/p) y turba (15%p/p). Todos estos elementos, excepto la turba, se solarizaron durante un año, como es habitual en este tipo de viveros. Se incorporó una vez trasplantadas un abono de liberación lenta, Osmocote-Mini© 18-6-12, a la dosis de 3 kg/m³ de sustrato.

La temperatura en el vivero se reguló durante todo el año entre 5°C y 35°C, con el objetivo de evitar heladas en invierno, así como temperaturas extremadamente altas en verano. Las plantas se regaron manualmente con una manguera que presentaba un difusor con agujeros finos una vez por semana. Estos riegos se incrementaban a dos veces por semana en verano.

Todas las plantas coexistieron en el mismo vivero hasta la finalización de los trabajos descritos en el presente trabajo.

2- Identificación del hongo contaminante

2.1.- Caracterización morfológica

Los primeros carpóforos se observaron en plantas no inoculadas de 11 meses de edad, y se fueron extendiendo posteriormente por todo el invernadero. Se emplearon claves (Breitenbach y Kränzlin 1984; Amicucci *et al.*, 2001) para identificar la especie a la que pertenecían los apotecios.

Posteriormente se tomaron muestras de raíz de las plantas en las que habían aparecido los carpóforos y se observaron bajo un microscopio estereoscópico en busca de micorrizas que pudieran pertenecer al hongo contaminante. Para ello se colocaron en placas de Petri con agua. Para su limpieza se emplearon pinzas, y en los casos en los que no se podían eliminar de este modo todas las partículas adheridas, se empleó un baño de ultrasonidos.

Una vez realizada una primera clasificación de los tipos micorrícicos presentes en función de sus caracteres, las micorrizas presentes se describieron según Agerer (2006) y descripciones específicas (Amicucci *et al.*, 2001).

2.1.- Caracterización molecular

A modo de confirmación se realizaron análisis de ADN tanto a apotecios como a las micorrizas presentes en los contenedores. Se empleó el método desarrollado por Amicucci *et*

al. (2001), una PCR con cebadores específicos de *P. constellatio*, y para mayor seguridad se secuenciaron los fragmentos amplificados.

Con la ayuda de unas pinzas se eliminaron las partículas de sustrato adheridas a los carpóforos y a las hifas de las micorrizas. Cuando no fue posible eliminar todas las adherencias de las micorrizas, éstas fueron lavadas en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

El ADN genómico se extrajo utilizando el Extract-N-Amp Plant PCR Kit® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), de acuerdo con las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones:

- 1.- Al hongo se añadieron 20µL de *Extraction solution* por muestra y se agitó.
- 2.- Se incubó a 95°C durante 10 minutos. A los 5 minutos se agitó.
- 3.- Se añadió 20µL de DILUTION SOLUTION y se agitó con vortex.
- 4.- Se centrifugó hasta 9.000 vueltas.
- 5.- Se conservó en nevera hasta su procesado.

La amplificación por PCR se realizó en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700, (Applied Biosystems), con cebadores específicos PV2 / ITS4 (Tabla 2.1) para *P. constellatio* siguiendo el protocolo establecido por Amicucci *et al.* (2001), ubicados entre la secuencia del gen 5.8S rRNA y la secuencia del gen 28S rRNA.

Tabla 2.1.- Cebadores empleados para la identificación de *Pulvinula constellatio*.

PV2 (forward):	5'-CAAGCTTGAATTCATTCATGAC-3'
ITS4 (reverse):	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Como testigo negativo se sustituyó el ADN por agua ultrapura estéril y como testigo positivo se empleó una extracción de un trabajo anterior.

La reacción de amplificación constó de una etapa inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C seguida de 35 ciclos que consistían en una desnaturalización de 30 segundos a 94°C, hibridación de 30 segundos a 59°C y una elongación de 45 segundos a 72°C. La elongación final fue a 72°C durante 7 min.

Para la realización de la amplificación se preparó una suspensión de 25 µL que contenía 2,5 µL de ADN extraído, 5 µL (5x) de MyTaq Red Reaction Buffer (Bioline, London, UK), 1 µL (10mg/L) de Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 14 µL de agua ultrapura, 1 µL (10 µM) de cada cebador y 0,5 µL (2,5U/µL) de MyTaq polimerasa (Bioline, London, UK).

La presencia de productos de PCR se verificó mediante electroforesis en un gel al 1,5% de D-1 agarosa (Pronadisa, Madrid, España), con un tampón estándar TAE 1 X (EDTA Tris acetato) (Sambrook *et al.*, 1989) durante 35 minutos a 100V y teñido con 0,8µL de solución Midori Green DNA stain (Nippon Genetics).

3.- Monitorización de la contaminación

3.1.- Aparición de carpóforos

Desde la primera observación de los carpóforos, en noviembre de 2014, hasta noviembre de 2015, las plantas fueron monitoreadas con el objetivo de observar el comportamiento del hongo en invernadero. Cada dos días, las plantas se revisaron para detectar nuevos contenedores con carpóforos los cuales se etiquetaron, anotando la fecha de detección.

No se retiró ninguna planta del invernadero en este período con la intención de no interferir en la propagación natural del hongo por el invernadero, y el mantenimiento y cuidado de las plantas se mantuvo como hasta el momento.

3.2.-Análisis micorrícico de las plantas

En primavera de 2016 se tomaron muestras de cada lote de plantas, para observar la existencia de diferencias en el comportamiento del hongo dependiendo de las especies de trufas, especies de árboles, cantidad de micorrizas de trufa o edad de la planta. De esta forma, se seleccionaron al azar cinco plantones con apotecios y cinco plantas que no presentaban carpóforos de cada uno de los grupos de la tabla 2.2. Se entiende como lote a cada uno de los 10 tratamientos diferentes en cuanto a especie fúngica, especie vegetal, edad y tipo de contenedor presentes en el ensayo.

Tabla 2.2.- Plantas analizadas de cada lote presente en el invernadero cuando se produjo la contaminación clasificadas en función del año de inoculación, la especie de trufa inoculada y la presencia de apotecios de *Pulvinula constellatio* en la superficie del contenedor.

Año de inoculación	Edad	Número de plantas analizadas					
		<i>T. melanosporum</i>		<i>T. aestivum</i>		No inoculadas	
		Con apotecios	Sin apotecios	Con apotecios	Sin apotecios	Con apotecios	Sin apotecios
2013	3	5	5	5	5	5	5
2014	2	5	5	-	-	-	-
2015	1	5	5	-	-	5	5

Cabe recordar que la diversidad de plantas presentes en el invernadero, y la falta de homogeneidad en las plantas muestreadas se debe a que se trabajó en todo momento con una contaminación fortuita en un vivero de investigación en el que los lotes de plantas se realizaron en función de la necesidad de ensayos del laboratorio, no habiendo un criterio común todos los años.

Las plantas se lavaron debajo del grifo con cuidado de no perder masa radical y se almacenaron a -20°C hasta el procesamiento de acuerdo con el método descrito por Palazón *et al.* (1999a).

La identificación morfológica y anatómica de las ectomicorrizas de *Tuber* se realizó siguiendo las descripciones de Zambonelli *et al.* (1993) y Rauscher *et al.* (1995). Otros contaminantes de vivero se describieron según los estudios de Agerer (2006) y Agerer y Rambold (2004-2013). La identificación morfológica de *P. constellatio* se realizó del modo que se detalló en el apartado anterior.

4.- Cultivo *in vitro*.

El cultivo en condiciones controladas de un hongo puede facilitar su conocimiento. Por ello, una vez identificado el hongo, se procedió a intentar su aislamiento para su posterior cultivo *in vitro* bajo diferentes condiciones.

Se llevaron a cabo los procedimientos habituales en laboratorio para el aislamiento de hongos, comenzando con medios de cultivo y técnicas de desinfección con la que había sido aislada *S. brunnea* (Sánchez *et al.*, 2014a), y se reorientaron hacia otras alternativas de aislamiento conforme los resultados no eran los esperados.

Ensayo 1: Cultivo mediante siembra de apotecios

Siguiendo los trabajos llevados a cabo por Sánchez *et al.* (2014a) se tomaron 75 carpóforos de diferentes edades, y se desinfectaron con lejía comercial al 10% durante 10 minutos. Se aclararon con agua y se secaron con papel. Se trituraron con un micropistilo y se

añadieron 100µL de agua. Todos los elementos fueron esterilizados antes de ser empleados. A partir de aquí se realizaron tres diluciones (1:10/1:100 y 1/1000) que se sembraron en cinco medios de cultivo comerciales (5 repeticiones por medio y dilución), Agar agua (AA) (AppliChem Panreac; USA), Patata Dextrosa Agar (PDA) (Oxoid USA, Inc., Columbia, Md.), Agar Nutritivo (NA) (Oxoid USA, Inc., Columbia, Md.), Malta Extracto Agar (MEA) (AppliChem Panreac; USA) y Corn Meal Agar (CMA) (AppliChem Panreac; USA). Se incubaron a 24°C.

- Ensayo 1.1.- Rehidratación

Se tomaron de nuevo 75 carpóforos y se repitió el proceso anterior hidratando los carpóforos durante dos horas en agua.

- Ensayo 1.2.- Desinfección sin lejía y con antibiótico

Por si la desinfección con lejía pudiera interferir en la germinación de las esporas, se realizaron dos tratamientos eliminándola y añadiendo al medio antibiótico para minimizar las contaminaciones bacterianas. Estos tratamientos consistieron en un cultivo de un carpóforo machacado tres semanas antes, y mantenido en nevera, y cultivo de carpóforos hidratados sin desinfección previa. Solamente se realizó la dilución 1:1, realizando 5 repeticiones de cada medio. Las colonias que crecieron se aislaron en PDA+ 0,3g/L de estreptomycin, y a MEA + 0,3 g/L de estreptomycin. Las placas se incubaron a 24°C.

- Ensayo 1.3.- Desinfección con lejía al 2% y con antibiótico

Debido a la gran cantidad de contaminaciones obtenidas en el ensayo 1.1, se desinfectó con lejía al 2%, y se añadió antibiótico en dos medios para disminuir las contaminaciones. Los carpóforos se machacaron realizando dos diluciones para su siembra, 1:1 y 1:10. Se emplearon cinco medios de cultivo, PDA, PDA+ 0,3g/L de estreptomycin, MEA, MEA + 0,3g/L de estreptomycin y Woody Plant Medium (WPM). Se realizaron 5 repeticiones para cada medio. Las placas se incubaron a 24°C.

- Ensayo 1.4.- Desinfección UV

Se realizó un tratamiento con irradiación con luz ultravioleta (UV) de onda larga (400-315nm), exponiendo a los carpóforos durante 4, 6 y 8 horas. Se irradiaron 5 carpóforos en cada periodo de tiempo. Los apotecios se sembraron en cuatro medios de cultivo (CMA, MEA, PDA y NA), y las placas se incubaron a 24°C.

Ensayo 2: Cultivo a partir de esporas

Una vez realizados los intentos de cultivo mediante siembra, se realizaron diferentes ensayos para la obtención de micelio a partir de esporas. Para ello se separaron 15 carpóforos para cada uno de los ensayos y se limpiaron bajo la lupa. Estos carpóforos, a los que no se les realizó ningún otro tratamiento de desinfección, se colocaron en el interior de placas Petri en

diferentes condiciones con la intención de hacer germinar las esporas una vez liberadas de las ascas:

- Ensayo 2.1: Se colocaron los carpóforos en el interior de placas Petri de cristal, sobre un cubreobjetos autoclavado. El cubreobjetos, transcurridas 72 horas a 24°C se pasó a PDA. Las placas se mantuvieron en estufa a 24°C.
- Ensayo 2.2: Los carpóforos se colocaron en el centro de placas de Petri de 90mm de diámetro de poliestireno con medio de cultivo tanto en la base como en la tapa, para evitar que la electricidad estática llevara las esporas hacia la parte superior. Se empleó como medio de cultivo PDA y MEA. Las placas se mantuvieron en estufa a 24°C.
- Ensayo 2.3: Los carpóforos se pegaron con liga en el lateral de placas de Petri de 90mm de diámetro de poliestireno con medio de cultivo MEA tanto en la base como en la tapa. Las placas se mantuvieron en estufa a 24°C.

Ensayo 3.- Cultivo a partir de conidios

En el caso de *S. brunnea* el cultivo a partir de conidios fue fructífero (Sánchez *et al.*, 2014a). Ante la ausencia de conidios de *P. constellatio* se trató de obtener su micelio a partir de estos propágulos infectivos que pudieran estar presentes en los contenedores del invernadero. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

- Ensayo 3.1: Se cultivó suelo de los contenedores, a dilución 1:10 y 1:100.
- Ensayo 3.2: Se cultivó la suspensión obtenida tras pasar una torunda estéril por la superficie de los contenedores y agitarla en un tubo eppendorf con agua estéril con vortex.
- Ensayo 3.3: Se cultivó celo pegado en la superficie de los contenedores.

En todos los casos se empleó como medio de cultivo PDA y las placas fueron incubadas a 24°C.

Ensayo 4.- Cultivo previo choque térmico

- Ensayo 4.1: Dado el carácter carbonícola de *P. constellatio* (Breitenbach, 1984), se realiza un cultivo con choque térmico siguiendo el trabajo realizado por Webster *et al.* (1964), en el cual se trata de obtener esporas como en el Ensayo 2.3 (depositando carpóforos en placas Petri con cubreobjetos autoclavados y pegando los carpóforos en los laterales de las placas). Se preparó MEA y se dejó en el baño María a 70°C, preparando también la estufa de cultivo a esa temperatura. Se sirvió el medio en las placas donde los carpóforos habían esporulado, y se procedió al mantenimiento de las

placas a 70°C durante 15 minutos, a 37°C durante 24 horas, y posteriormente se bajó la temperatura para su incubación a 24°C.

- Ensayo 4.2: Se colocaron carpóforos sobre placas con medio de cultivo MEA y se flamearon con un mechero durante tres segundos. Las placas fueron incubadas a 24°C.

Ensayo 5.- Cultivo a partir de cámara húmeda

Se recolectaron carpóforos del invernadero, se desinfectaron con lejía al 10% durante 10 minutos y se aclararon con agua estéril. Se colocaron en un recipiente de plástico desinfectado con lejía, donde se colocó papel estéril humedecido con agua. Se mantuvo a 24°C durante 72 horas y el micelio que emanaba de los carpóforos se cultivó en MEA a 24°C.

Ensayo 6.- Medios ricos en nitrógeno

Al tratarse de un hongo pionero capaz de desarrollarse en zonas quemadas donde el Nitrógeno aumenta considerablemente, se pensó que este podría ser un nutriente relevante para el cultivo in vitro, por lo que se trató de aislar en un medio rico en nitrógeno. Para ello se probó un medio con excrementos de conejo. Se realizó de dos formas diferentes, por infusión y por machacado.

- Por infusión. Se calentó 1L de agua con 20g de heces por litro. Se llevó a ebullición durante 20 minutos. Se filtró el hervido con una muselina y sobre el filtrado se añadieron 15g de agar por litro.
- Por machacado. Se preparó 1L de agar (15g de agar por litro). Se machacaron las heces con un mortero. Se juntaron con el medio y se autoclavó.

Tal y como se observa en la tabla 2.3 se cultivaron 50 micorrizas y 50 carpóforos, desinfectando con dos concentraciones de lejía (10% y 20%) y con cinco tiempos diferentes de desinfección (10", 20", 30", 45" y 1'). Todos los carpóforos fueron aclarados con agua estéril y secados con papel de filtro autoclavado.

Se añadió también PDA como tercer medio de cultivo, resultando un total de 300 placas cultivadas en este ensayo entre todas las combinaciones.

- Ensayo 6.2.- Técnicas de desinfección

Al observarse contaminaciones por bacterias se intentó un nuevo protocolo de desinfección, que varió en tiempo en función de si se trabaja con micorrizas o con carpóforos.

1. Lavado de los carpóforos y las micorrizas con agua estéril.
2. Lavado con etanol al 10%, durante un minuto si se trataba de micorrizas, y durante 30 segundos si se trataba de carpóforos, agitando cada 15 segundos.

3. Aclarado con agua estéril.
4. Lavado con hipoclorito de sodio al 5%, durante diez minutos si se trataba de micorrizas, y durante 5 minutos si se trataba de carpóforos, agitando cada minuto.
5. Aclarado con agua estéril.
6. Secado con papel de filtro estéril.

Se realizaron dos repeticiones empleando únicamente hipoclorito de sodio al 10%. El medio de cultivo en todos los casos fue el de heces de conejo licuado (Tabla 2.3).

Tabla 2.3.- Tratamientos de desinfección realizados con etanol+hipoclorito de sodio, y solamente con NaClO.

MICORRIZAS	Alcohol 1' + NaClO 10"	NaClO 10"
	10 placas	10 placas
CARPÓFOROS	Alcohol 30" + NaClO 5"	NaClO 10'
	10 placas	10 placas

Ensayo 7.- Modificación del pH de los medios de cultivo

Se midió el pH del sustrato de las plantas en las que se estaban desarrollando los apotecios de *P. constellatio*, y se comprobó que se encontraba entre 8 y 9. Por ello se realiza un último intento de cultivo ajustando el pH del medio PDA hasta 8,5 agregando KOH (1M) o HCl (1M). Se emplearon para el cultivo micorrizas y carpóforos empleando para su desinfección hipoclorito de sodio al 15% y al 30% y etanol al 50%, manteniendo el material sumergido para su desinfección 30", 1', 1'30" y 2' en el caso de emplear lejía, y 15", 30", 45" y 1' en el caso de emplear alcohol.

Ensayo 8.- Utilización de medios de cultivo empleados con éxito en otros hongos ectomicorrícicos

Por último, se realizó un intento con hongos que de acuerdo a la bibliografía consultada, permitían crecimientos óptimos en otros hongos micorrícicos (Tabla 2.4). Se trata de los medios BAF, MMN, Modified M40 (Kibar y Peksen, 2011, Sánchez *et al.*, 2000), Fries agar, Fungus host medium (Thongklang *et al.*, 2010), MMS (Michael, 1982) y WPM (Wenkart *et al.*, 2001).

Tabla 2.4.- Componentes de los diferentes medios empleados en el presente trabajo que, de acuerdo a la bibliografía, permiten el crecimiento de otros hongos micorrícicos. Las unidades son g/L excepto en los casos en los que se indica otra unidad

	FRIES (Fries, 1979)	FUNGUS HOST (Vaario <i>et al.</i> , 2000)	Modificado M40 (Kibar y Peksen, 2011)	MMS (Murashige y Skoog, 1962)	WPM (Lloyd y McCown, 1981)	MMN (Honrubia <i>et al.</i> , 1995)	BAF Moser, 1960)
(NH ₄) ₂ HPO ₄		0,300	0,25			0,25	
Ácido fólico							0,0001
Carbón activado		0,0003					
Agar			15	8		15	15
Biotin stock	100µL						0,00001
Cloruro de calcio	0,2	0,200	0,0668	0,3322	0,096	0,05	0,1
Nitrato de calcio					0,556		
Ácido cítrico 1 H ₂ O	5 (Trace el.)						
Cloruro de cobalto		0,00001		0,000025			
Sulfato de cobre	0,25 (Trace el.)	0,00002		0,000025	0,000025		
Na ₂ -EDTA		0,020		0,03726	0,0373		
Extracto de levadura							0,2
Extracto de malta			5				
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6 H ₂ O	1 (Trace el.)						
FeCl ₃ (1%)			0,0005			1,2	0,01
FeSO ₄ 7H ₂ O		015		0,0278	0,0278		
Glucosa		10	10			10	30
Glycina				0,002	0,002		
Ácido bórico	0,05 (Trace el.)	0,0005		0,0062	0,0062		
KH ₂ PO ₄	2		0,5			0,5	0,5
KI		0,0001		0,00083			
Sulfato de Magnesio	1	0,400	0,15	0,1807	0,37	0,15	0,5
Malta						3	
MnSO ₄ H ₂ O	0,05 (Trace el.)	0,001		0,0169	0,0223		0,005
Molibdato	0,05 (Trace el.)	0,00001		0,00025	0,00025		
Myo-inositol		0,1		0,1	0,1		0,05
NaCl	0,2		0,025			0,025	
NH ₄ tartrato	10						
NH ₄ NO ₃	2		2	1,65	0,4		
Ácido nicotínico		0,005		0,0005	0,0005		
Peptona							2
Nitrato de potasio				1,9			
Potasio fosfato monobase				0,170	0,17		
Potasio sulfato					0,9		
Pyridoxina HCl		0,0005		0,0005	0,0005		
sacarosa				30			
Thiamina - HCl		0,005	0,01	0,0001	0,001	0,0005	0,0005
Trace elemens	200µL						
ZnSO ₄ 7H ₂ O (Zinc sulfate - 7H ₂ O)	5 (Trace el.)	0,0001		0,0086	0,0086		0,001

5.-Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa informático R (R 3.6.3 GUI 1.70) (R Foundation for Statistical Computing, 2016).

La frecuencia de aparición de carpóforos de *P. constellatio* y la proporción de ápices colonizados por esta especie fueron analizados empleando modelos lineales generalizados (binomiales) (GLM). Las diferencias Post-hoc entre los lotes existentes se analizaron mediante medias de mínimos cuadrados ($p > 0.05$).

La edad de los plantones (Edad), la especie de trufa inoculada (Trufa), el árbol huésped (Árbol), el tipo de contenedor (Contenedor) y la situación dentro del invernadero (Sección Invernadero) fueron las variables incluidas. En el GLM de la colonización de raíces, la presencia de apotecios en el contenedor (Carpóforo) fue también incluida como variable. Fueron también probadas interacciones de dos factores. Se seleccionó el modelo con menor criterio de información de Akaike (AIC).

Se analizaron diferentes supuestos estadísticos, y cuando el modelo presentaba sobredispersión (mayor varianza de la esperada), se empleó un GLM quasibinomial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Identificación del hongo contaminante

1.1.- Caracterización morfológica

La primera observación del hongo fueron apotecios en las plantas inoculadas en el vivero. Se observaron carpóforos discoides agrupados, de hasta 3mm de diámetro y de color naranja sobre la superficie de algunos contenedores. Presentaban el margen bien definido de jóvenes y eran planos o convexos cuando eran más maduros. Se realizaron 30 mediciones de apotecios, siendo el tamaño máximo de 2,7mm de diámetro, el mínimo de 0,8, y la media de 1,67mm. Eran sésiles, con el himenio convexo de color amarillo o anaranjado, desarrollándose en agregados.

En microscopio se observaron ascas octospóricas. Mediciones de 70 ascosporas dieron como media 16,3 μ m, con un máximo de 21,8 μ m y un mínimo de 12,96 μ m. Las ascosporas eran esféricas, uniseriadas, lisas, hialinas, con numerosas gúttulas de aceite en su interior. Paráfisis más largas que las ascas, septadas y con numerosas gotitas de pigmentación amarillo-anaranjada en su interior (Fig. 2.4). Estas características también fueron observadas en *P. constellatio* por otros autores (Pfister, 1976; Yao y Spooner, 1996; Medardi, 2001; Lenne, 2004).

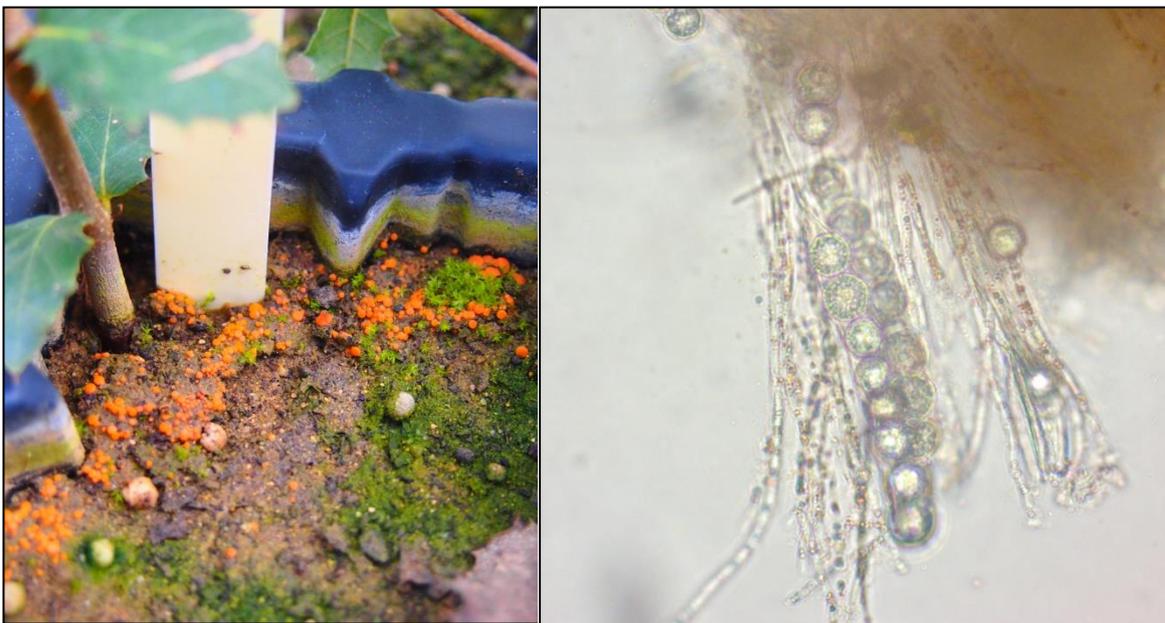


Figura 2.4.- Apotecios desarrollándose en contenedor de planta micorrizada (Izquierda). Ascas y paráfisis de *Pulvinula constellatio* a microscopio (Derecha).

Se observaron ectomicorrizas blanquecinas con ramificación simple en ambas especies arbóreas (*Q. ilex* y *Q. faginea*), en algunos casos compartiendo raíces con ectomicorrizas de *T. melanosporum*.

Estas micorrizas eran finas, blancas, sin cistidios y con hifas blancas con exudados emanando del manto, caracteres también observados por Amicucci *et al.* (2001) para *P. constellatio* (Fig. 2.5). En la mayoría de casos no existía un manto bien definido. Se observó un manto plectenquimático, aunque el acceso a la visualización del mismo era complicado debido a la cantidad de hifas presentes en las micorrizas. Esta cantidad de elementos que emanaban del manto provocaba la presencia de partículas adheridas a la misma, hecho que dificultó la limpieza de la micorrizas para su cultivo *in vitro*.

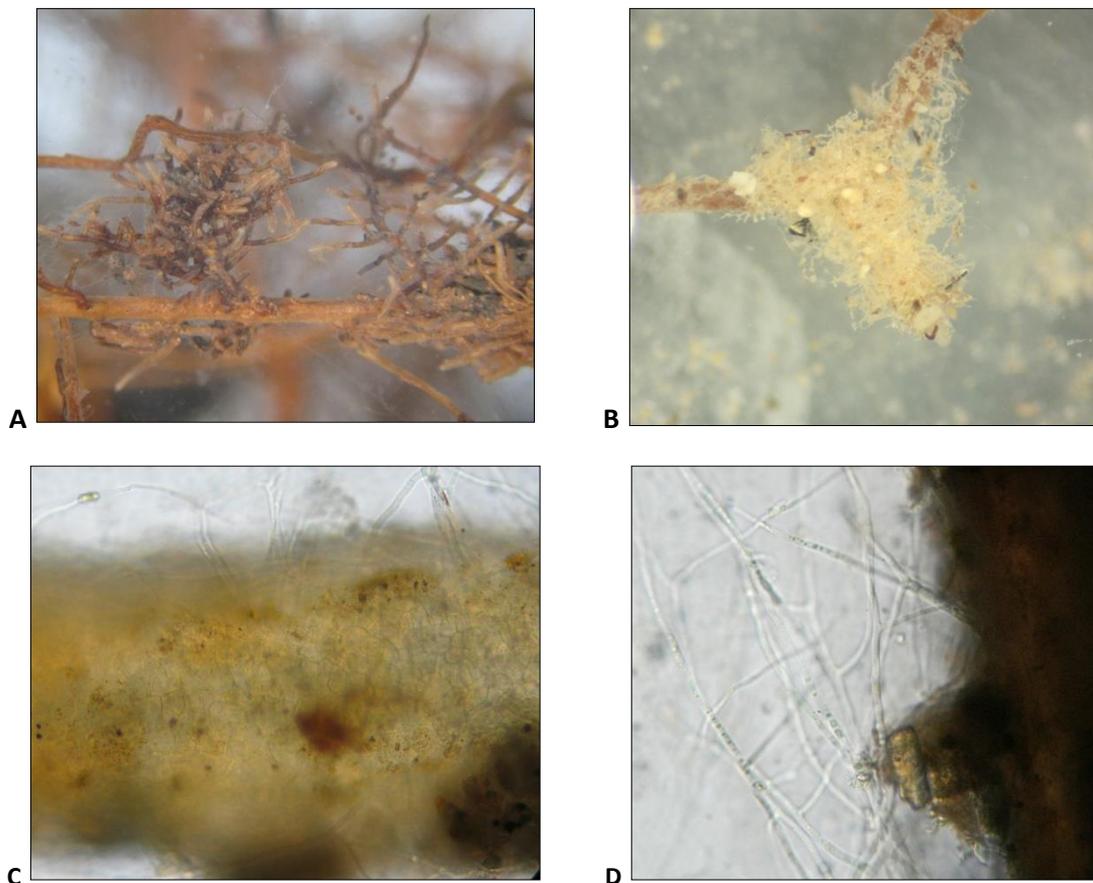


Figura 2.5.- Micorriza de *Pulvinula constellatio*. A: Imagen general de raíz con ectomicorrizas bajo microscopio estereoscópico. B: Detalle de micorriza de *P. constellatio* bajo microscopio estereoscópico, donde pueden observarse una gran cantidad de hifas y partículas adheridas. C: Detalle del manto bajo microscopio óptico. D: Detalle de hifas con exudados.

1.2.- Caracterización molecular

La utilización del Extract-N-Amp Plant PCR Kit® para la extracción del DNA de las muestras, junto con el empleo de los cebadores específicos PV2 / ITS4 para *P. constellatio* (Amicucci *et al.*, 2001), dieron resultado positivo tanto para micorrizas como para apotecios.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 224 pares de bases, que fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El análisis BLAST confirmó que las secuencias obtenidas eran idénticas a las presentes en GenBank para la misma especie fúngica con 97-100% de cobertura de consulta y 99-100% de coincidencias de identidad, respectivamente. Las secuencias se enviaron a Genbank con los números de acceso KT119608-KT119614. Algunos apotecios y ectomicorrizas también se depositaron en el herbario de la Universidad de Navarra (Pamplona, España) con los números de acceso: PAMP-Mycotheca 0321 y PAMP-Mycorrhiza 210, respectivamente.

La confirmación de la presencia de *P. constellatio* en el invernadero de truficultura del CITA supone el primer hallazgo de este hongo en viveros españoles. Este resultado supone la identificación de un problema todavía no determinado hasta el momento en España. La repercusión económica que supone este hongo en los viveros españoles todavía no ha sido medida. Sin embargo en otros países productores de planta micorrizada con trufa negra, principalmente en Italia, *P. constellatio* es considerado como un hongo contaminante oportunista y muy agresivo (Marozzi *et al.*, 2018).

Los resultados de la identificación de *P. constellatio* se presentaron en un congreso, y se expusieron al sector en numerosas jornadas divulgativas. Gracias a esta difusión se localizaron otros viveros de producción de planta micorrizada con este problema de contaminación, y se sospecha que pueda haber estado presente anteriormente, ya que anotaciones previas de analistas de planta micorrizada describen micorrizas con unas características similares a las de *P. constellatio*.

2.- Comportamiento de *Pulvinula constellatio*

2.1.- Observación de la dinámica de carpóforos

La primera detección de *P. constellatio* fue en noviembre de 2014, en cinco plantones inoculados en abril del mismo año. Estos apotecios se detectaron en la superficie de contenedores que contenían bellotas germinadas en diciembre de 2013 e inoculadas con esporas de trufa en abril de 2014.

Hubo dos focos de infección, uno en cada extremo del invernadero, en dos cuerpos diferentes. En febrero de 2015 hubo nuevos focos en las mismas zonas, en las que se observaron apotecios en seis plantas más. Desde agosto a noviembre de 2015 la infección se extendió por todo el invernadero. Se encontraron carpóforos en 156 plantas nuevas. El máximo incremento de número de plantas se dio entre los meses de agosto a noviembre. Entre febrero y abril de 2016 la presencia de apotecios era generalizada en las instalaciones.

La distribución total de apotecios de *P. constellatio* en el invernadero puede observarse en la Figura 2.6.

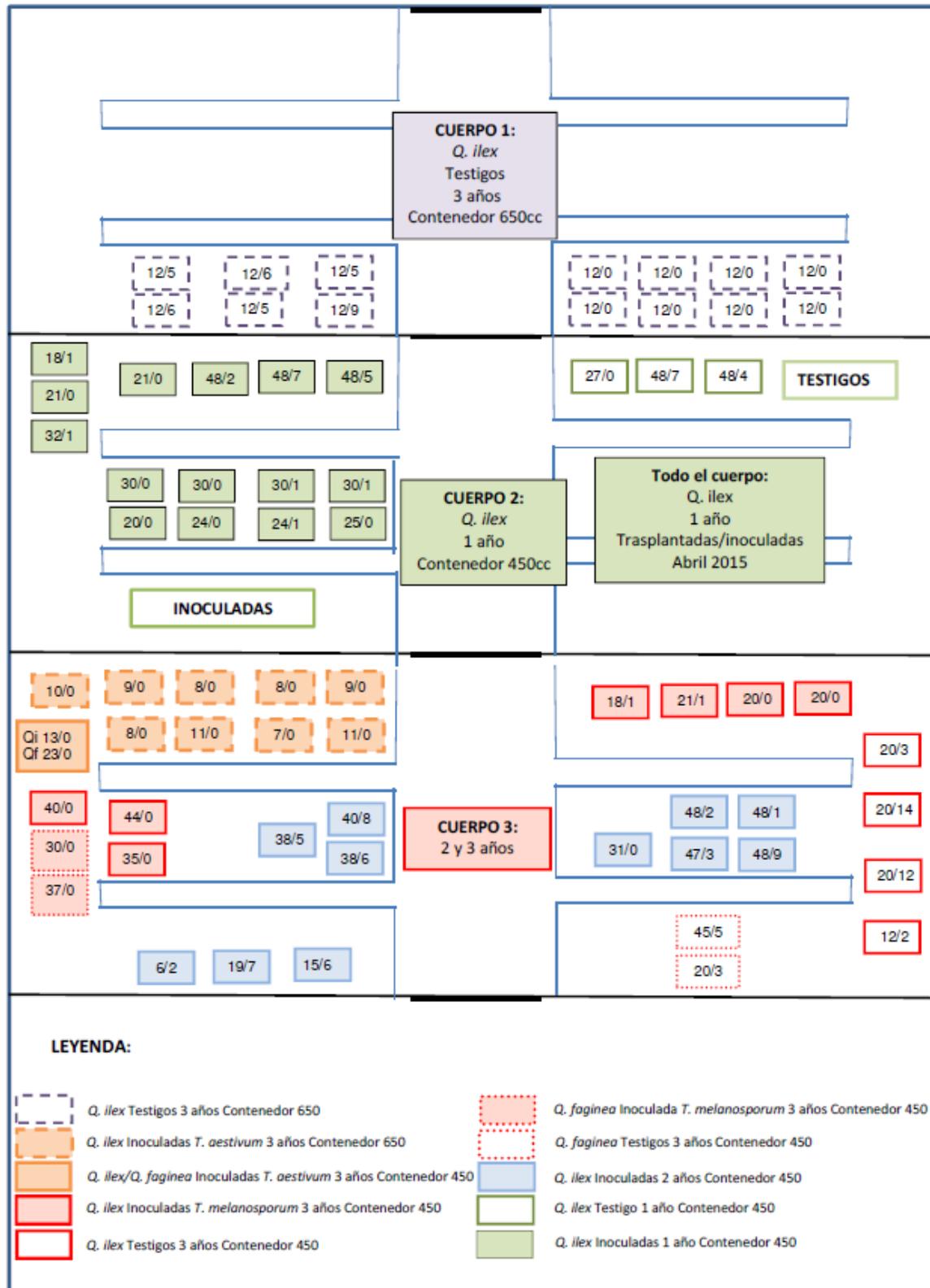


Figura 2.6.- Resultados de la monitorización de la aparición de carpóforos de *Pulvinula constellatio* en el invernadero. Dentro de cada caja representada se indica el número de plantas total /el número de plantas en las que aparecieron carpóforos de *P. constellatio*.

En la tabla 2.5 se muestra la frecuencia media pronosticada de aparición de carpóforos de *P. constellatio* en los contenedores presentes en el invernadero en función de la especie vegetal, la edad del árbol, la especie fúngica inoculada, el tipo de contenedor y el cuerpo del invernadero en el que se encontraban las plantas. Los resultados muestran que la frecuencia de aparición de carpóforos de *P. constellatio* en los contenedores se ajusta al GLM propuesto, con un p-valor <0,001 (n=1617) para la variable "lote". Por tanto, podemos afirmar que esta variable lote afecta a la aparición de carpóforos de *P. constellatio*, lo que significa que los carpóforos no están repartidos por igual en el invernadero, sino en función del lote.

Tabla 2.5.- Frecuencia media pronosticada por el modelo GLM de aparición de carpóforos de *Pulvinula constellatio* en contenedores para los lotes de plántulas presentes en el invernadero cuando se produjo la contaminación. Los valores estimados en la tabla son en tanto por uno. Los lotes con valores que no comparten letras tienen diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$; método de medias de mínimos cuadrados).

Árbol	Edad	Trufa	Contenedor	Cuerpo	Valor medio predicho	Sig.	ic.inf	ic.sup	n
QI	1	T	450	2	0.0894	bc	0.05022	0.1543	123
QI	1	TM	450	2	0.0423	cd	0.02715	0.0654	449
QI	2	TM	450	3	0.1321	b	0.10126	0.1705	371
QI	3	T	650	1	0.1801	b	0.12815	0.2472	168
QI	3	T	450	3	0.4306	a	0.32168	0.5466	72
QI	3	TA	650	3	0	e	-	-	81
QI	3	TM	450	3	0.0101	d	0.00253	0.0395	198
QF	3	T	450	3	0.1231	bc	0.06276	0.2273	65
QF	3	TA	450	3	0	e	-	-	23
QF	3	TM	450	3	0	e	-	-	67

Árbol: QI: *Q. ilex*; QF: *Q. faginea*. Edad: 1: 1 año; 2: 2 años; 3: 3 años. Trufa: T: testigos sin inocular; TA *T. aestivum*; TM *T. melanosporum*. Contenedor: 650 bandeja de 650cc ; 450: Full Pot de 450cc. Cuerpo del invernadero. Ubicación de las plantas dentro el invernadero cuando se produjo el foco de infección. 1: cuerpo 1; 2: cuerpo 2; 3: cuerpo 3

No aparecieron carpóforos en las plantas de tres años correspondientes a los tratamientos siguientes:

- *Q. ilex* inoculada con *T. aestivum* en contenedor de 650cc
- *Q. faginea* inoculada con *T. aestivum* en contenedor Full Pot®
- *Q. faginea* inoculada con *T. melanosporum* en contenedor Full Pot®

Hay una cantidad muy baja (1%) en encinas de tres años inoculadas con *T. melanosporum* en contenedor Full Pot® de 450cc.

Se trata en los cuatro casos de plantas que presentaban porcentajes de micorrización por género *Tuber* muy elevados, tal y como puede observarse en la Figura 2.7. Posiblemente por este motivo, los propágulos infectivos de *P. constellatio* no encontraron en estas plantas raíces libres de micorrizas donde poder desarrollarse. Los resultados muestran ausencia o presencia en muy bajos niveles de carpóforos en aquellas plantas que presentan porcentajes altos de micorrización por especies del género *Tuber*, independientemente de que se trate de *T. melanosporum* o *T. aestivum*.

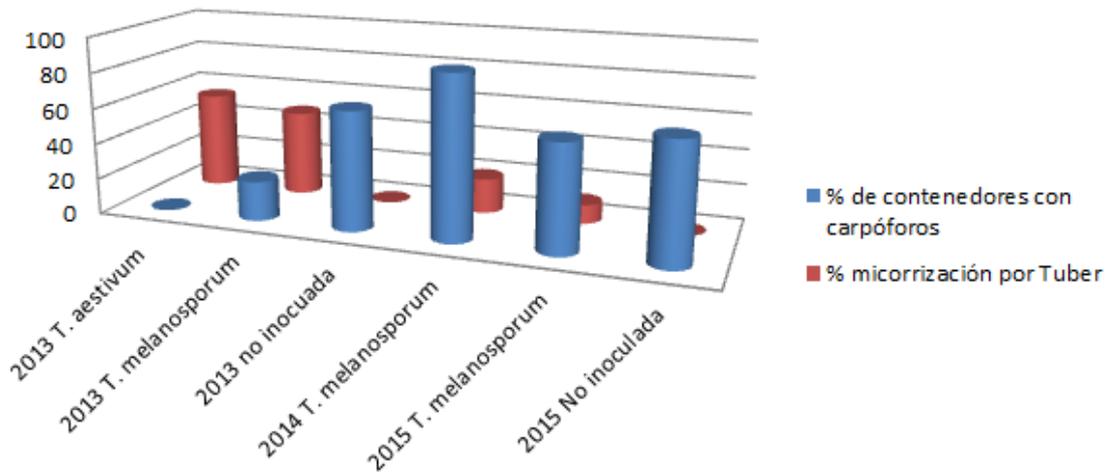


Figura 2.7.- Porcentaje de contenedores con carpóforos de *P. constellatio* dentro de cada lote frente al porcentaje de micorrización por *Tuber* del mismo

Hay también un bajo porcentaje de plantas con carpóforos (4,23%) en *Q. ilex* de un año inoculadas con *T. melanosporum*.

Mayor porcentaje de carpóforos presentan los testigos de 1 año de encina y 3 años de quejigo (ambas en contenedor Full Pot®), con un 8,94% y un 12,31% respectivamente.

Las encinas de dos años inoculadas con *T. melanosporum* en contenedor Full Pot® y los testigos de tres años de encina en contenedor de 650cc presentan porcentajes similares, de 13,21 y 18,01% respectivamente.

La aparición de carpóforos fue significativamente superior en plantas no inoculadas y en plántulas jóvenes. La mayor presencia de carpóforos se determinó en los testigos no inoculados de 3 años. Estas plantas estaban ubicadas donde comenzó el ataque, y son las que habían permanecido más tiempo en el vivero.

Tal y como se observa en la tabla 2.6, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto al porcentaje estimado de carpóforos entre *T. aestivum* y *T. melanosporum*, ni entre las especies forestales (encina y quejigo) de la misma edad.

Para planta de tres años, los lotes inoculados con ambas especies de trufa no presentan carpóforos de *P. constellatio* en sus contenedores (y cuando lo hacen es en niveles muy bajos). Se trata de plantas inoculadas con anterioridad a la aparición de los primeros carpóforos.

2.2.- Análisis micorrícico de las plantas

En la Tabla 2.6 se muestra el porcentaje medio de ápices micorrizados por *P. constellatio* en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero. Los resultados muestran que el porcentaje de ápices micorrizados por *P. constellatio* en los contenedores se ajusta al modelo GLM propuesto, con un p-valor <0,001 (n=89) para la variable lote. Por tanto, podemos afirmar que esta variable lote afecta al porcentaje de ápices micorrizados por *P. constellatio*, lo que significa que el hongo no está repartido por igual en el invernadero, sino en función del lote.

Tabla 2.6.- Frecuencia media pronosticada de ápices micorrizados por *P. constellatio* estimado en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero cuando se produjo la contaminación. Los lotes con valores que no comparten letras tienen diferencias significativas entre sí (medias de mínimos cuadrados e intervalo de confianza del 95%). Los valores estimados son en tanto por uno.

Árbol	Edad	Trufa	Contenedor	Cuerpo del invernadero	Valor medio predicho	Sig.	ic.inf	ic.sup	n
QI	1	T	450	2	0.426	a	0.4108	0.4408	10
QI	1	TM	450	2	0.428	a	0.4135	0.4428	10
QI	2	TM	450	3	0.075	d	0.066	0.0841	9
QI	3	T	450	3	0.223	b	0.2116	0.2356	10
QI	3	TA	650	3	0	f	-	-	10
QI	3	TM	450	3	0.044	e	0.0377	0.0513	10
QF	3	T	450	3	0.154	c	0.1445	0.1643	10
QF	3	TA	450	3	0	f	-	-	10
QF	3	TM	450	3	0.032	e	0.0268	0.0379	10

Árbol: QI: *Q. ilex*; QF: *Q. faginea*. Edad: 1: 1 año; 2: 2 años; 3: 3 años. Trufa: T: testigos sin inocular; TA *T. aestivum*; TM *T. melanosporum*. Contenedor: 650 bandeja de 650cc ; 450: Full Pot de 450cc. Cuerpo del invernadero. Ubicación de las plantas dentro el invernadero cuando se produjo el foco de infección. 1: cuerpo 1; 2: cuerpo 2; 3: cuerpo 3.

Tal y como se puede observar en la tabla 2.7, en la que se muestran los porcentajes de micorrización contabilizados por cada una de las especies fúngicas en cada uno de los lotes, las plantas que presentan un menor valor de porcentaje estimado de micorrización por *P. constellatio* son aquellas que en la evaluación del estado de micorrización han presentado mayores porcentajes de micorrización por *T. melanosporum*. Este hecho también fue observado por García-Montero *et al.* (1997) en una contaminación también fortuita de *S. brunnea* en un invernadero. En ese caso, se observó que solamente eran colonizadas las plantas que estaban pobremente micorrizadas con *T. melanosporum*. En nuestro ensayo, las plantas que presentan un menor valor de porcentaje estimado de micorrización por *P. constellatio* son aquellas que presentan valores elevados de porcentaje de micorrización por *Tuber* spp.:

- Plantas de tres años inoculadas con *T. aestivum*. Presentan porcentajes de micorrización por *Tuber* de 49.32% en *Q. ilex* y de 59,53% en *Q. faginea*.
- Plantas de tres años inoculadas con *T. melanosporum*. Presentan porcentajes de micorrización por *Tuber* de 49,15% en *Q. ilex* y de 47,37% en *Q. faginea*.
- Planta de dos años inoculadas con *T. melanosporum*. Presenta un porcentaje de micorrización por *Tuber* de 19,45% en *Q. ilex* (27,41% en plantas que presentaban carpóforos de *P. constellatio*, y 11,48% en plantas en los que no aparecieron carpóforos de *P. constellatio*).

Tabla 2.7.- Porcentajes de ápices micorrizados medios contabilizados por *Pulvinula constellatio* (% *Pulvinula*), por *Tuber melanosporum* (%TM) y por *Tuber aestivum* (%TA) para cada uno de los lotes del ensayo.

Tratamiento	Edad (años)	Especie vegetal	% <i>Pulvinula</i>	%TM	%TA
Testigos	3	<i>Q. ilex</i>	24,02		
Testigos	3	<i>Q. faginea</i>	17,93		
Inoculada <i>T. aestivum</i>	3	<i>Q. ilex</i>	0		49,32
Inoculada <i>T. aestivum</i>	3	<i>Q. faginea</i>	0		59,53
Inoculada <i>T. melanosporum</i>	3	<i>Q. ilex</i>	4,633	49,13	
Inoculada <i>T. melanosporum</i>	3	<i>Q. faginea</i>	2,58	47,37	
Inoculada <i>T. melanosporum</i>	2	<i>Q. ilex</i>	7,62	20,33	
Inoculada <i>T. melanosporum</i>	1	<i>Q. ilex</i>	40,44	10,61	
Testigos	1	<i>Q. ilex</i>	41,14		

Los resultados muestran ausencia o muy bajos niveles de micorrizas de *P. constellatio* en aquellas plantas que presentan porcentajes altos de especies del género *Tuber* en sus raíces,

independientemente de que se trate de *T. melanosporum* o *T. aestivum*. Las plantas cuyo porcentaje de micorrización por *Tuber* supera el 45% muestran porcentajes de contaminación por *P. constellatio* por debajo del 10%.

En el lado opuesto, los valores más elevados de estimación de porcentaje de ápices micorrizados por *P. constellatio* son los correspondientes a las plantas sin inocular (consideradas como testigos en el presente trabajo), y a las inoculadas más jóvenes (un año), que presentan porcentajes de micorrización por *T. melanosporum* bajos (1,6%). En este lote de plantas jóvenes *P. constellatio* presenta porcentajes elevados de micorrización, pudiendo alcanzar más del 40% de ápices micorrizados por esta especie contaminante.

Marozzi y colaboradores (2018) observaron que en planta de 9 meses inoculada con *Tuber mesentericum* Vittad. *P. constellatio* ocupa más rápidamente las raíces que *T. mesentericum*. Esta contaminación pareció impactar negativamente en la micorrización por *T. mesentericum*, que llegó más tarde, creció más lentamente y le quedaba menos espacio y recursos. Este efecto de competencia en el que el primer organismo en colonizar afecta negativamente al último en llegar debido a la apropiación del recurso compartido, es denominado "efecto de prioridad" (Kennedy, 2005). Los hongos ectomicorrícicos pueden emplear varias estrategias para ganar ventaja sobre sus competidores. Algunos de estos mecanismos pueden ser interacciones directas como la esporofagia (Fries y Swedjemark, 1985), el micoparasitismo (Agerer, 1990), o el crecimiento superpuesto (Wu *et al.*, 1999). Otro modo de que los hongos ectomicorrícicos ganen ventaja competitiva es colonizando recursos más rápidamente que sus competidores. Los colonizadores primarios afectan negativamente a los que llegan con posterioridad, y con los que deben compartir los recursos.

En el presente trabajo, este hecho puede ser observado en los dos sentidos. En las plantas inoculadas en 2013 los porcentajes de micorrización por *T. melanosporum* son mucho más elevados. Este hecho sugiere que, por una parte, la colonización por *P. constellatio* llegó más tarde que la formación de micorrizas por parte de *T. melanosporum*, por lo que *P. constellatio* al llegar más tarde, creció más lentamente y le quedaba menos espacio y recursos. Por otra parte, sugiere que *P. constellatio* no parece ser capaz de desplazar a *Tuber* de las raíces una vez formadas sus micorrizas, habiéndose observado niveles muy bajos de micorrización por *P. constellatio* en las plantas que se inocularon antes de la aparición de los primeros carpóforos, y que en el seguimiento de la micorrización previa a la aparición de *P. constellatio* en el invernadero ya se observaron porcentajes muy elevados de *T. melanosporum* en sus raíces.

Cuando las bellotas se germinan en el invernadero, se realiza un tratamiento de desinfección en el sustrato a emplear con la intención de evitar hongos micorrícicos competidores. Sin embargo este hecho puede convertirse en una oportunidad para *P. constellatio*, capaz de formar micorrizas con mayor rapidez que *T. melanosporum* y *T.*

aestivum, y fructificar en un corto espacio de tiempo, completando de este modo su ciclo biológico. Este es un comportamiento similar al de *S. brunnea* (Sánchez *et al.*, 2014a).

En el otro sentido, aquellas plantas que se inocularon una vez aparecieron los carpóforos de *P. constellatio* en el vivero presentan porcentajes de micorrización por *Tuber* muy inferiores a las de 2013, y aunque el año de inoculación fue diferente, se inocularon siguiendo el mismo protocolo, con el mismo inóculo y por el mismo equipo de trabajo. Esto abre la posibilidad de suponer que la contaminación por *P. constellatio* pudo llegar en 2014, y posiblemente a causa de la falta de desinfección de la turba utilizada. Con posterioridad a la elaboración de este ensayo se descubrió contaminación por este hongo en otras instalaciones de producción de planta micorrizada en España, y en todas ellas era común el uso de la misma marca comercial de sustrato.

Comparando las predicciones para los porcentajes de micorrizas y de carpóforos (Tabla 2.8), en la que se muestra la frecuencia media pronosticada de presencia de micorrizas y carpóforos de *P. constellatio* estimado en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero, se observa que aunque las cifras más bajas de carpóforos coinciden con los valores inferiores de micorrizas, esto no siempre se cumple para los valores más elevados. En el caso de la planta más joven del invernadero (testigos y planta inoculada de 2015), se prevé un valor elevado de micorrizas (42,6% y 42,8%), pero un valor bajo de carpóforos (8,9% y 4,2%). En este sentido parece que el porcentaje de micorrización no tiene siempre la relación esperada con la aparición de carpóforos. Los mecanismos que desencadenan la fructificación en hongos ectomicorrícicos son todavía hoy en día desconocidos (Le Tacon *et al.*, 2016), aunque se puede pensar que las condiciones ambientales del invernadero son iguales en todas las zonas, podría no ser del todo cierto. Otra opción es que la fructificación sí dependa de la densidad de micelio extrarradical o del número total de micorrizas de la planta. Estos valores no han sido estimados en el presente trabajo. Además hay que tener en cuenta que la planta más joven del invernadero fue lógicamente la que menos tiempo permaneció en las instalaciones, y por lo tanto en la que menos tiempo estuvo desarrollándose *P. constellatio*.

Tabla 2.8. - Frecuencia media pronosticada de presencia de micorrizas y carpóforos de *Pulvinula constellatio* estimado en cada uno de los tratamientos presentes en el invernadero (medias de mínimos cuadrados e intervalo de confianza del 95%). Los valores estimados son en tanto por uno.

Árbol	Edad	Trufa	Contenedor	Valor medio predicho MICORRIZAS	Valor medio previsto CARPOFOROS
QI	1	T	450	0.426	0.0894
QI	1	TM	450	0.428	0.0423
QI	2	TM	450	0.075	0.1321
QI	3	0	450	0.223	0.4306
QI	3	TA	650	0	0
QI	3	TM	450	0.044	0.0101
QF	3	0	450	0.154	0.1231
QF	3	TA	450	0	0
QF	3	TM	450	0.032	0

Árbol: QI: *Q. ilex*; QF: *Q. faginea*. Edad: 1: 1 año; 2: 2 años; 3: 3 años. Trufa: T: testigos sin inocular; TA *T. aestivum*; TM *T. melanosporum*. Contenedor: 650 bandeja de 650cc; 450: Full Pot de 450cc.

Pulvinula constellatio muestra un comportamiento carbonícola típico, habiéndose observado:

- altas tasas de colonización de raíces cuando las raíces están libres de otros hongos ectomicorrícicos
- concluye rápidamente su ciclo de vida mediante el desarrollo de cuerpos fructíferos, extendiendo así sus esporas rápidamente a otras plántulas

Teniendo en cuenta estas características, una higiene adecuada es crucial para evitar la entrada de hongos micorrícicos competidores en los viveros de producción de planta micorrizada. Cada componente del sustrato utilizado en el proceso de micorrización debe desinfectarse adecuadamente, así como las herramientas y equipos presentes en las instalaciones. Es importante la presencia de elementos estructurales que permitan una óptima desinfección. En este sentido cobra una especial relevancia el suelo del invernadero. Se desaconsejan suelos de tierra, gravilla o cualquier otro elemento que no permita una correcta desinfección.

Además de esta prevención se recomienda la revisión continuada de los lotes de los viveros comerciales a lo largo de la campaña, ya que la presencia de carpóforos es una detección tardía del hongo en las raíces.

Se confirma por tanto la peligrosidad de este hongo y el riesgo que se asume al no tomar medidas estrictas al detectar los primeros carpóforos.

En caso de contaminación con *P. constellatio*, es aconsejable la extracción de toda la planta contenida en el invernadero, independientemente de su edad u hongos inoculados. Se requiere una desinfección severa, incluida la estructura del invernadero, el suelo y los bancos. Obviamente, todo el material utilizado en el proceso de inoculación también debe desinfectarse. Como en cualquier otro caso de control de plagas, la prevención es siempre la mejor opción.

3.- Cultivo in vitro

Con la intención de ampliar el conocimiento de las condiciones de crecimiento de *P. constellatio*, y poder aplicarlas para su control en invernadero, se trató de conseguir el cultivo *in vitro* a partir de carpóforos, micorrizas y sustrato, del mismo modo que se consiguió por este equipo de trabajo con el hongo *S. brunnea* (Sánchez *et al.*, 2014a). Debido a las características similares en cuanto a hábitat y comportamiento, así como su aparente similitud genética (Landvik *et al.*, 1997) se iniciaron los aislamientos con los medios de cultivo con los que *S. brunnea* se desarrolló de forma óptima. Sin embargo, no hubo crecimiento en las placas cultivadas. Por ello se probaron diferentes medios de cultivo con y sin antibiótico, temperaturas de crecimiento, cámara húmeda, diferentes pH, y en ninguno de los casos se obtuvieron resultados positivos.

De cada intento de cultivo de *P. constellatio* se aislaron los crecimientos fúngicos que aparecían. Cada uno de ellos se identificó morfológicamente, y a aquellos que se desconocían, o existía la sospecha de que pudiera tratarse de *P. constellatio* se les realizó una extracción de ADN y una PCR con los primers PV2-ITS4.

En todo el proceso de aislamiento existieron hongos que aparecían sistemáticamente en los cultivos. En estos casos se secuenciaron, resultando ser *Pestalotiopsis* sp. y *Gliocladium* Corda. Este último, junto con *Trichoderma* Pers., también frecuente en estos cultivos, son especies de hongos empleados en biocontrol.

En ningún caso se consiguió el desarrollo de micelio en condiciones controladas. Sin embargo esta falta de resultados puede ser de utilidad para el futuro cultivo de esta especie, habiendo adquirido conocimiento sobre todas las técnicas que no han funcionado.

Hutchison (1991) especuló sobre los caracteres de diagnóstico para identificar hongos ectomicorrícicos. En su clave determinó que no eran micorrícicas aquellas colonias que presentaban cualquiera de las siguientes características:

- Degradación de celulosa o lignina
- Fuerte actividad de pectinasa
- Producción de conidios
- Tasas de crecimiento rápido

Sin embargo, estas características no son cumplidas por todos los hongos, principalmente por los pezizales pioneros post-incendio. Por ejemplo, *S. brunnea* forma ectomicorrizas (Danielson, 1984), y sin embargo, tiene tasas de crecimiento rápidas y produce conidios (Sánchez *et al.*, 2014a). Además degrada eficazmente la celulosa y la lignina y produce fenol oxidasas (Danielson, 1984; Egger, 1986).

Por lo tanto, ciertos Pezizales poseen características consideradas poco frecuentes en los hongos ectomicorrícicos, siendo más típicas de los saprofiticos. Sin embargo, si los mutualismos micorrícicos se originan a partir de saprofiticos, como sugieren Hibbett *et al.* (2000), no debería sorprender encontrar características saprotróficas en mutualismos micorrícicos. De hecho, los estudios moleculares recientes están mostrando un gran número de especies de hongos de la familia Pyronemataceae que forman micorrizas (Smith *et al.*, 2007; Tedersoo *et al.*, 2006), rompiendo la idea de que las especies pertenecientes a esta familia eran principalmente saprófitas y raramente fitopatógenas.

De acuerdo a Petersen (1985), las especies de Pyronemataceae se encuentran en una amplia gama de hábitats, siendo capaces de fructificar en todo tipo de suelos, incluyendo tierra quemada, estiércol, hojas en descomposición, hojas, madera y musgos vivos, prefiriendo un pH alto y un bajo contenido de materia orgánica.

Sin embargo si se cumple la divergencia demostrada por Hansen *et al.* (2013) de *P. constellatio* con el resto de Pyronemataceae, a la que sugiere que, junto con los linajes *Boubovia*, *Geopyxis*, *Pseudombrophila* sean excluidos de esta circunscripción taxonómica, el cultivo *in vitro* de este hongo, tal y como se ha observado, podría no ser tan factible como otros pezizales cultivados en laboratorio, como *S. brunnea* o *T. woolhopeia*.

A través de un análisis de rRNA, Perry *et al.* en 2007 realizaron un análisis filogenético en el que exponen un modelo de clasificación compuesto por 14 clados. En esta propuesta de clasificación queda manifiesta la cercanía entre *S. brunnea* y *T. woolhopeia* y su lejanía entre ellas con *P. convexella*. Este hecho pondría de manifiesto el diferentes manejo de las instalaciones en caso de contaminación por estas especies, e incluso diferencias en su cultivo *in vitro*, ya obtenido por este equipo en el caso de *S. brunnea* (Sánchez *et al.*, 2014a) y de *T. woolhopeia* (datos no publicados).

Por no haberse conseguido el cultivo *in vitro* (y con él un método de inoculación controlado de este contaminante) y por tratarse de una contaminación fortuita, en este trabajo se ha monitorizado la contaminación como único recurso para el estudio de su comportamiento. Asumimos que, a no ser que estuviese uniformemente incorporado al sustrato empleado en el vivero, la contaminación no ha sido uniforme, ni se conoce el momento de llegada del primer propágulo al invernadero, lo que limita el alcance de nuestras conclusiones.

Capítulo 3

Identificación del patógeno causante
de las malformaciones tumorales en
encinas en España



INTRODUCCIÓN

Desde que se incrementó esta tendencia al monocultivo y la densificación zonal de las plantaciones, el número de plagas y enfermedades asociadas al cultivo de la trufa ha ido en aumento. De hecho, insectos que convivían en equilibrio en el medio natural han evolucionado a plaga en los últimos años. Ente ellos destaca una patología que está causando preocupación entre truficultores, recolectores e investigadores. Se trata de unas formaciones tumorales que aparecen en ramas y troncos de las encinas (*Quercus ilex* L.). Se tiene constancia de su presencia tradicionalmente en zonas forestales. Sin embargo, desde que se incrementara la densificación de las plantaciones truferas, su incidencia ha aumentado, tanto en plantaciones como en el monte circundante a estos cultivos.

Sintomatología

Esta sintomatología se ha detectado tanto en plantas jóvenes a partir de dos o tres savias hasta plantas adultas ya establecidas.

En masas adultas los síntomas de esta patología son un decaimiento general de la planta que, con el tiempo, en los casos más avanzados presenta hojas cloróticas, así como una importante pérdida foliar. Comienzan a observarse masas tumorales en ramas y tallos jóvenes, y es en las zonas de la copa inmediatamente superiores a la aparición de estos tumores donde la clorosis y el debilitamiento son más evidentes. Sin embargo, el síntoma más incuestionable es la aparición de protuberancias en tallos, ramas y en el tronco. Es frecuente la aparición de rebrotes en la parte basal del árbol, algunos de ellos presentando también pequeñas malformaciones. Esta sintomatología descrita se observa en la Figura 3.1.



Figura 3.1.- Sintomatología característica de pies afectados por este agente patógeno. Encina que presenta masas tumorales en la práctica totalidad de sus ramas, así como una incipiente defoliación y hojas cloróticas (Izquierda). Herida abierta en tronco de encina que presenta sintomatología de esta enfermedad (Derecha).

Los tumores comienzan a extenderse por el árbol, hasta que en los casos más severos alcanza el tronco principal, donde se forman malformaciones de gran tamaño y aparecen heridas abiertas y fendas. Con el tiempo se produce un debilitamiento generalizado del árbol, y en determinados casos se acaba produciendo la muerte del mismo, habiendo sido generalmente a su vez afectado por otras plagas secundarias.

En plantaciones jóvenes se observa una marcada clorosis de los pies afectados, que en un primer momento pueden confundirse con una falta de adaptación de la planta. Sin embargo, se aprecian claramente unas malformaciones en el tronco principal (Fig. 3.2).

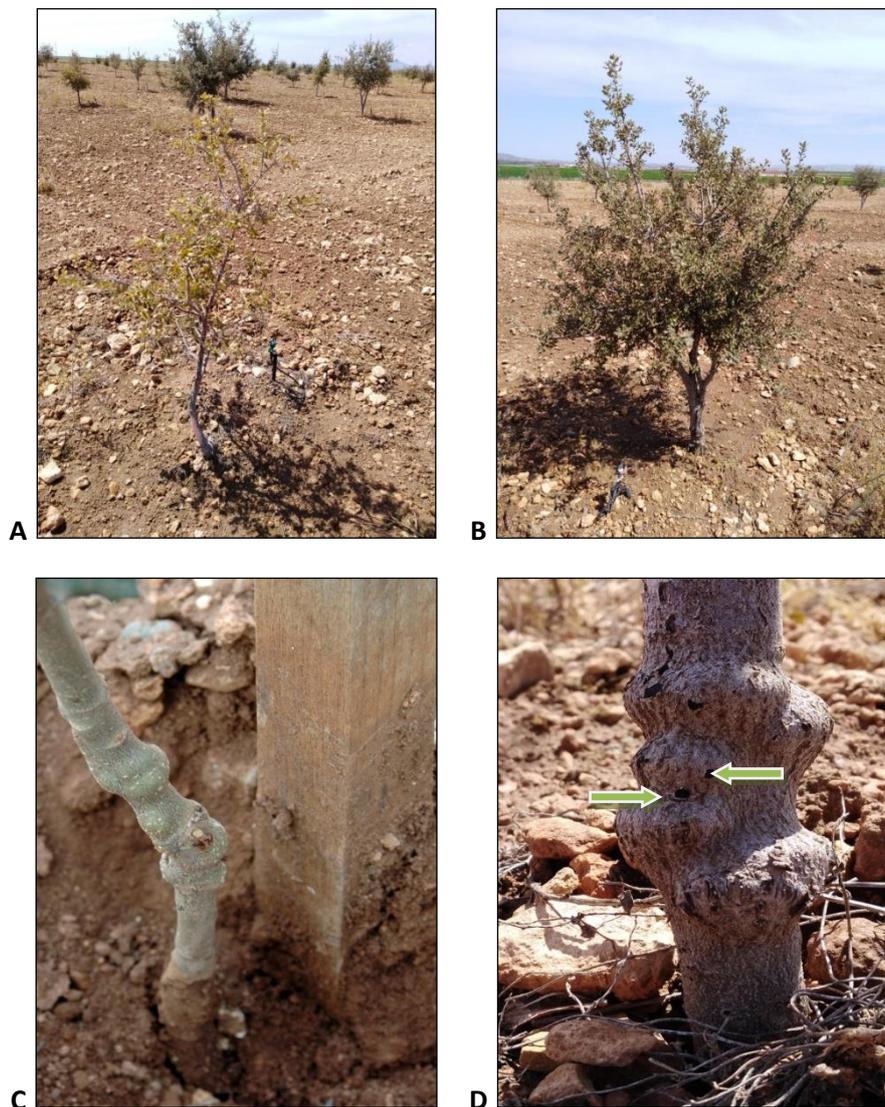


Figura 3.2.- Plantas jóvenes afectadas por las tumoraciones. A: Pie clorótico; B: Planta que sufre un decaimiento generalizado; C: Tumores que aparecen desde la base del tronco; D: Perforaciones provocadas por plagas secundarias en un pie que presenta tumores desde la base del tronco.

Estos pies son capaces de sobrevivir, aunque con notables deficiencias, que se manifiestan en los síntomas ya mencionados. Es de observar la aparición de rebrotes en la parte basal de forma habitual.

En ocasiones se ha tratado esta sintomatología con abonados, así como con aportes de quelato (principalmente de hierro). Aunque la planta parece en un principio aparentar una mejoría, y los síntomas parecen mermar, el agente causal de la enfermedad continúa afectando al árbol, por lo que estos tratamientos, aunque sean capaces de enmascarar temporalmente los síntomas, no son capaces de evitar el problema.

En análisis previos llevados a cabo por el Centro de Sanidad y Certificación Vegetal (CSCV) que trataron de identificar el agente causal de esta enfermedad se descartó la posibilidad de que se tratase de un hongo, bacteria o virus. La no detección de necrosis en los vasos, así como las características de la sintomatología, principalmente la clorosis, desarreglos vegetativos, decaimiento general, o la proliferación de yemas adventicias que al desarrollarse originan ramificaciones de un solo punto, dando lugar a “escobas de bruja”, encaminaron los estudios hacia la posibilidad de que un fitoplasma estuviera implicado en la etiología de esta enfermedad.

Fitoplasmas

Los fitoplasmas son organismos pertenecientes a un clado monofilético de la clase Mollicutes (Lim y Sears, 1992; Pagliari y Mussetti, 2019). La primera vez que fueron detectados fue a mediados de 1960, y fueron referidos inicialmente como MLO (Mycoplasma-Like-Organisms) por su similitud morfológica con los micoplasmas, microorganismos parásitos de animales (Lee *et al.*, 2000).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: Tenericutes

Clase: Mollicutes

Orden: Acholeplasmatales

Familia: Acholeplasmataceae

Género: *Candidatus* Phytoplasma

Las características generales de los fitoplasmas son un genoma pequeño (530-1350kbp), bajo contenido en G+C y carencia de pared celular (Bobé *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2005). Esta ausencia de pared celular los hace resistentes a antibióticos que inhiben la síntesis de ésta, como la penicilina, aunque sí que son sensibles a la tetraciclina y a sus análogos, a la lisis por choque osmótico, detergentes y alcoholes (Bertaccini, 2007).

Los fitoplasmas se desarrollan en el floema, que es más rico en nutrientes que el xilema. Se cree que esta riqueza es la causante de que los fitoplasmas no sean cultivables en laboratorio, por existir nutrientes que hoy en día no se han identificado y son indispensables para el crecimiento de estos organismos en condiciones controladas. Hasta el momento se sabe que los fitoplasmas son biotrofos obligados del hábitat de plantas e insectos vectores, siendo solamente capaces de sobrevivir en ambientes isotónicos como el floema de las plantas o la hemolinfa de los insectos (Bertaccini, 2007; Pagliari y Mussetti, 2019).

El hecho de que el patógeno no pueda ser cultivable *in vitro* supone un problema para establecer los postulados de Koch. Por este motivo, no se les ha asignado un nombre binomial, estableciendo en su remplazo un taxón provisorio similar al género de “*Candidatus Phytoplasma*” (“*Ca. Phytoplasma*”) para aquellos fitoplasmas que han sido descritos molecularmente (Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group (IRPCM), 2004).

Los fitoplasmas pueden ser transmitidos por uno o varios vectores, dependiendo del grado de especificidad en la interacción fitoplasma-insecto. Existen fitoplasmas con baja especificidad por el vector a los que se les conocen varias especies de insectos transmisores de la enfermedad. En cambio, otros fitoplasmas sólo se transmiten por un vector (Alma *et al.*, 1997).

El tipo de alimentación de estos vectores determinará la capacidad de expansión del fitoplasma a otras especies sensibles. Si los vectores son monófagos u oligófagos, diseminarán el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, mientras que si el insecto vector se alimenta de diferentes plantas, el fitoplasma podrá afectar a un mayor rango de especies sensibles. Al tratarse de patógenos que se alimentan del floema, se encuentran principalmente en los haces vasculares, pasando de célula a célula con la ayuda de los fluidos vasculares, por lo que no necesitan flagelos u otras estructuras de transporte (Hogenhout *et al.*, 2008).

Hasta ahora se han relacionado insectos del orden Homoptera como vectores), principalmente de las familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae (De Liñán, 1998; Bové *et al.*, 2003; Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007; Sabate *et al.*, 2018). El insecto, a través de la alimentación adquiere estos patógenos de los tejidos del floema. Los fitoplasmas penetran en el intestino para posteriormente moverse y multiplicarse en la hemolinfa y en otros órganos. También invaden las células de las glándulas salivales, permitiendo de este modo la transmisión de la enfermedad a plantas sanas durante el proceso de alimentación (Regassa y Gasparich, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Los fitoplasmas son capaces incluso de infectar los huevos del insecto vector (Bertaccini, 2007).

Una vez que el insecto vector adquiere el fitoplasma, debe existir un periodo de incubación para que ese insecto pueda transmitirlo (Christensen *et al.*, 2005). Este periodo es variable, principalmente por las condiciones térmicas presentes, pero de acuerdo a los trabajos realizados por Weintraub y Beanland (2006) para los fitoplasmas puede durar hasta 80 días.

Se ha observado una posible relación entre la presencia de estos tumores en encinas y el homóptero *Kermes* spp., (Fig. 3.3) tanto en invernadero como en campo. Es muy frecuente que

plantas que sufran estas tumoraciones hayan tenido previamente ataques de *Kermes*, o incluso en casos en los que la presencia de *Kermes* se alarga en el tiempo, ambos lleguen a coincidir en el mismo pie. Por otra parte, un vivero donde se detectaron plántulas con tumores, sufría también un ataque de esta cochinilla.

Al tratarse de un insecto con aparato bucal chupador, sería un posible candidato. Las investigaciones en este momento están enfocadas en este sentido, habiendo en la actualidad un proyecto del Programa de I+D+i orientada a los Retos de la Sociedad del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades en el que se está trabajando en esta hipótesis (Diseño e implementación de sistemas multiproductivos sostenibles en truficultura y análisis de los servicios ecosistémicos asociados (TUBERSYSTEMS)).



Figura 3.3.- Larvas de *Kermes ilicis* (naranja) sobre una malformación tumoral en pie de *Quercus ilex*.

Por los estudios llevadas a cabo con otros fitoplasmas, su control es muy complicado cuando ya están afectando a un cultivo, ya que no se conocen métodos curativos, y la existencia de plantas tolerantes a estos organismos son muy raras. Por estos motivos las estrategias de control se basan en:

- Erradicación de las plantas infectadas para disminuir la cantidad de inóculo
- Producción y uso de material de reproducción sano
- Tratamientos fitosanitarios contra el agente vector

OBJETIVOS

En este tercer capítulo se planteó un único objetivo a alcanzar:

- La comprobación de que un *Candidatus* phytoplasma es el agente causal de las tumoraciones que afectan a las plantaciones de encina en España como primer paso hacia la gestión de los daños que provoca.

MATERIAL Y MÉTODOS

1- Material vegetal

Se tiene constancia de la presencia de esta sintomatología en varias comunidades autónomas españolas, principalmente en Aragón, Cataluña, Comunidad Valenciana, Castilla la Mancha y Castilla León. Es en las estribaciones del Sistema Ibérico (Castellón y Teruel) donde se tiene conocimiento de la mayor incidencia de la enfermedad, posiblemente también debido a la mayor concentración de plantaciones truferas en este área. Por estos motivos las muestras fueron tomadas en diferentes zonas de la provincia de Teruel, en la Comarca de Gúdar-Javalambre y concretamente en los municipios de San Agustín y Manzanera (Fig. 3.4).

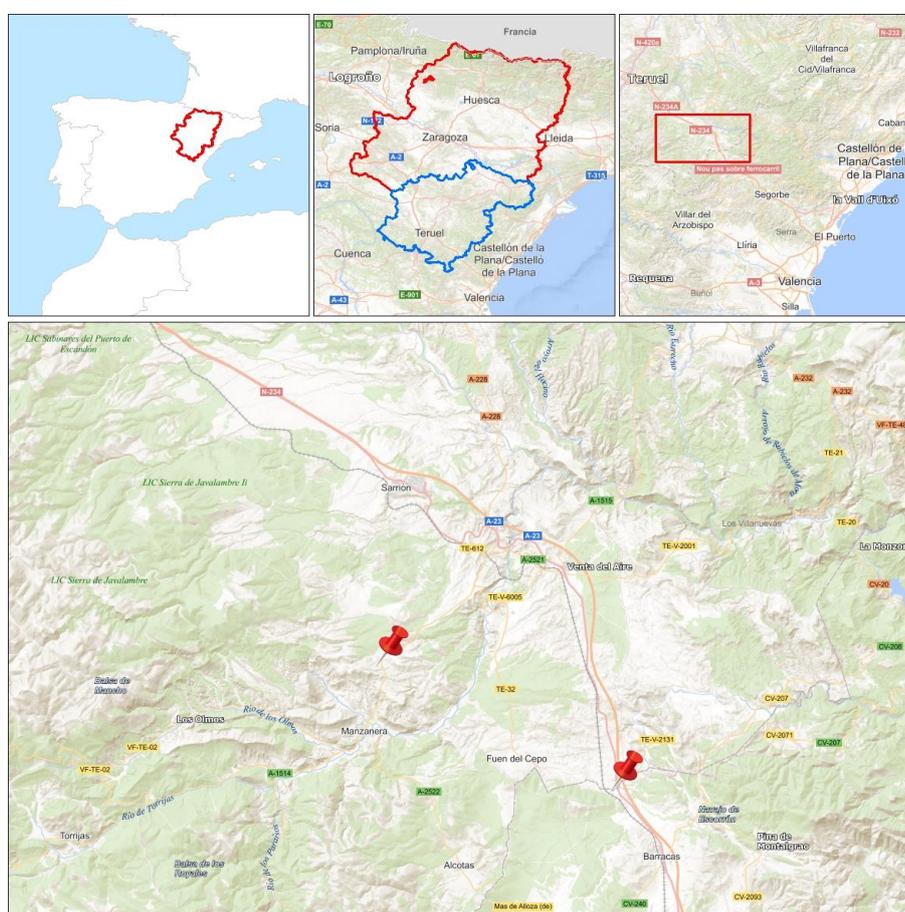


Figura 3.4.- Mapa de ubicación de las parcelas en las que se obtuvo el material vegetal sintomático para la identificación del agente causal mediante análisis moleculares.

Todas las muestras sospechosas de estar contaminadas fueron tomadas de tejido sintomático, siguiendo los trabajos de Garcia-Chapa *et al.* (2003b), Christensen *et al.* (2004) y Necas y Krska (2006), ya que los fitoplasmas pueden no estar distribuidos de un modo

homogéneo en una planta, y la concentración de los mismos puede variar en función de la muestra, principalmente si se trabaja en hospedantes leñosos.

Debido a que los cambios estacionales pueden influir en la ubicación de los fitoplasmas en la planta y en su concentración (Seemüller *et al.*, 1984; Jarausch *et al.*, 1999; Berges *et al.*, 2000; Constable *et al.*, 2003; Prezelj *et al.*, 2012), se tomaron muestras en dos momentos del año. De acuerdo a los trabajos llevados a cabo por Seemüller *et al.* (1984) los fitoplasmas se encuentran en las raíces en la mayor parte de muestras durante todo el año. La reinvasión de la parte aérea desde las raíces ocurriría en abril o mayo. La población incrementaría durante el verano, alcanzando el máximo a finales de esta estación o principios de otoño. En diciembre comenzaría el retroceso de nuevo al sistema radical. Por este motivo, se realizó un primer análisis en primavera, y una comprobación posterior en otoño, cuando la concentración de fitoplasma en el floema se supone mayor.

Los análisis moleculares se realizaron sobre material vegetal que presentaba síntomas, procedente tanto de plantación como de vivero, y planta asintomática procedente de otro vivero como testigo negativo.

Como ya se ha comentado anteriormente, los fitoplasmas se alojan en los tubos cribosos del floema. Por este motivo, en la mayoría de enfermedades provocadas por fitoplasmas, las hojas son una óptima fuente de muestras. En este trabajo se analizaron tanto las hojas situadas en ramas que presentaban abultamientos como la corteza, tallos, raíz y rebrotes de plantas afectadas.

Fueron analizadas un total de 19 muestras de encina (*Quercus ilex* L.), entre testigos negativos y planta sintomática. Todas ellas procedían de dos plantaciones ubicadas en la Comarca Gúdar-Javalambre (Teruel), y de dos viveros.

Las muestras fueron tomadas en dos estaciones, primavera y otoño, de tres años consecutivos, 2011, 2012 y 2013 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.- Muestras procesadas en los trabajos llevados a cabo en función de la estación (primavera/otoño), el año (2011, 2012 o 2013), la procedencia (vivero/plantación), comentarios sobre su elección y el origen de la muestra en función de la parte del árbol (raíz, yema, peciolo, floema, corteza, nervio, brotes o rebrote)

ESTACIÓN	AÑO	PROCEDENCIA	COMENTARIOS	MUESTRA
Primavera	2011	Vivero Zaragoza	Testigo negativo	Raíz
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Yema apical
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Yema apical
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Peciolo
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Floema tallo
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Yema apical
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Corteza
Primavera	2011	Plantación	Sintomática	Yema apical
Primavera	2012	Plantación	Sintomática	Nervio hoja
Primavera	2012	Plantación	Sintomática	Floema tallo
Otoño	2012	Vivero	Sintomática	Yema apical
Otoño	2012	Vivero	Sintomática	Yema apical
Primavera	2013	Vivero Zaragoza	Testigo negativo	Raíz
Primavera	2013	Plantación	Sintomática	Brotes tallo
Primavera	2013	Plantación	Sintomática	Brotes tallo
Primavera	2013	Plantación	Sintomática	Brotes tallo
Primavera	2013	Vivero	Sintomática	Rebrote planta cortada
Primavera	2013	Vivero	Sintomática	Rebrote planta cortada
Primavera	2013	Vivero	Sintomática	Rebrote planta cortada

1.1.- Planta sintomática

Las **plantas jóvenes** permanecieron en un vivero de producción de planta micorrizada durante cinco años en contenedores forestales de 450cm³, presentando tumores, signo evidente de la presencia de la enfermedad (Fig. 3.5) a partir del segundo año.

Del mismo modo, aparecieron otros síntomas característicos como una marcada clorosis, y un deficiente desarrollo de la parte aérea.



Figura 3.5.- Plantas de cinco savias mantenidas en invernadero. Se observan señaladas con una flecha las malformaciones tumorales desarrollándose en el tallo.

Las muestras procedentes de **plantas adultas**, fueron tomadas de dos plantaciones de 15 años. Estos ejemplares presentaban tumores en ramas y tronco (Fig. 3.6), y manifestaban un decaimiento general.



Figura 3.6.- Malformación tumoral en rama de árbol adulto procedente de una plantación trufera. No se observa necrosis en el corte transversal.

Las muestras fueron cortadas con tijeras correctamente desinfectadas con lejía diluida al 10% para evitar posibles contaminaciones entre muestras. Una vez obtenidas, se conservaron a 4°C o a -20°C hasta su procesado.

1.2.- Controles

Para poder considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de amplificación se han tenido en cuenta controles positivos, un control negativo de amplificación y un control negativo de la planta.

El control positivo se utilizó para hacer un seguimiento de la eficiencia de la amplificación. En este caso como control positivo se empleó una muestra de ADN de *Candidatus Phytoplasma pyri* de un trabajo previo.

El control negativo se realizó en todos los casos añadiendo agua en vez de extracción de ADN a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción.

Para la realización del control negativo de la especie vegetal, necesario para asegurar que no haya amplificaciones inespecíficas debidas al ADN de *Q. ilex*, se emplearon encinas de dos savias cultivadas en invernadero, cuyo material vegetal provenía de semilla certificada del Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales "El Serranillo". El sustrato empleado para su cultivo fue una composición de 80% de tierra desinfectada mediante solarización procedente de una parcela agrícola, un 18% de Humin Substrat® y un 2% de perlita. El sustrato fue enriquecido con abono de liberación lenta (10-1-6) a razón de 3kg/m³.

La planta que iba a ser evaluada debía estar sana, asegurándose la no contaminación de la misma. Por ello, los plantones que se iban a emplear como testigos negativos se realizaron en el vivero del CITA del Gobierno de Aragón, lejos de cualquier masa forestal natural, o plantación trufera contaminada.

Para obtener la planta se comenzó por preparar un semillero del siguiente modo:

- Las bellotas se seleccionaron, eliminando aquellas que presentaban daños evidentes o un tamaño deficiente.
- Se pusieron en remojo, desechando las que flotaban por estar huecas o presentar daños causados por larvas de curculiónidos. Después se desinfectaron con lejía al 10% durante una hora y se aclararon.
- Se pregerminaron en bandejas con papel de laboratorio húmedo en una estufa a 24°C.
- Cuando comenzaron a germinar se colocaron en un lecho de 15cm de espesor de vermiculita N°3, preparado en cajas de plástico con superficie enrejillada en todas sus caras que se levantaron a unos 10cm de la bancada para facilitar el repicado de las raíces al contacto con el aire (Fig. 3.7).
- Se mantuvieron en el invernadero a una temperatura media aproximada de 20°C hasta el momento en que estuvieron preparadas para su trasplante.
- Todo el material empleado en el proceso fue previamente desinfectado con lejía: bandejas de pregerminación, cajas de rejilla, etc. y el propio invernadero.



Figura 3.7.- Autorrepicado de los plantones en cajas enrejilladas con vermiculita del número 3 al contactar con el aire.

Aproximadamente a los tres meses de edad estaban preparadas para ser trasplantadas. Debido a que la encina es especialmente sensible al trasplante, se seleccionaron aquellas

plántulas con mayor porte y vigor, que cumplieran los criterios de calidad de planta forestal (Cortina *et al.*, 2006).

Se emplearon contenedores forestales Full-pot de 450cm³ de capacidad. Las cajas se levantaron de nuevo para favorecer el repicado de las raíces.

Una vez realizado el trasplante, las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta su análisis molecular.

2.- Análisis moleculares

La detección e identificación del organismo causante de la enfermedad se ha llevado a cabo mediante técnicas moleculares. Concretamente, mediante PCR a tiempo real, y PCR anidada.

2.1.- Extracción de ADN

Existen diferentes métodos para la extracción de ácido nucleico para la detección de fitoplasmas mediante PCR. Es común en varios de ellos la existencia de una fase de enriquecimiento para concentrar los fitoplasmas antes de la extracción del ácido nucleico, debido a dos motivos. En primer lugar, la frecuentemente baja concentración de fitoplasmas en plantas leñosas perennes, y en segundo lugar, porque a menudo se extraen, junto con el ácido nucleico, concentraciones altas de compuestos como polisacáridos y polifenoles, que pueden inhibir la PCR.

En este caso, para la extracción de ADN se siguió el método de obtención de una fase enriquecida de fitoplasmas de Ahrens y Seemüller (1992) (Tabla 3.2). Se introdujo 1g del material vegetal fresco correspondiente (Fig. 3.8) en bolsas de extracción Bioreba añadiendo 8 mL del tampón PGB (0,01M K₂HPO₄; 0,03M KH₂PO₄, pH 7,6; 0,3M sacarosa; 0,15% BSA; 2% PVP-10) y 0,03M de ácido ascórbico. 2 mL del extracto vegetal resultante se transfirieron a un tubo eppendorf®. Se realizó una centrifugación de clarificación a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf® y se centrifugó 20 minutos a 13000 rpm. El precipitado se resuspendió en 461µL del tampón CTAB (Tris 1M, EDTA 20 mM, NaCl 1,4M, pH 8, CTAB 2%). Se añadió 2-mercaptoetanol al 0,2%, se incubó durante 20 segundos a 65°C, y se añadió cloroformo (V/V), agitando bien.



Figura 3.8.- Preparación de una muestra de tallo para su procesado.

Posteriormente se realizó una centrifugación a 11000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior fue transferida a un tubo de 2 mL, al que se añadió isopropanol frío (V/V) y se incubó durante 30 minutos a -20°C .

Por último se realizó una centrifugación durante 20 minutos a 12000 rpm a 4°C , y el precipitado final se lavó con 1 mL de etanol 70% centrifugando durante 5 minutos a 12000 rpm y a 4°C . El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 50 μL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

El ADN fue cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su amplificación.

Tabla 3.2.- Procedimiento de extracción de ADN de material vegetal procedente de encinas (*Quercus ilex*) sintomáticas.

Preparación del tampón PGB* (K_2HPO_4 0,01M, KH_2PO_4 0,03M, sacarosa 0,3M, BSA 0,15% y PVP-10 2%). Conservación en congelador hasta su utilización. Para su empleo, adición 528mg/100mL de ácido ascórbico ajustando el pH a 7,6
Homogeneización de las muestras en bolsas de extracción Bioreba añadiendo 8 mL del tampón PGB
Transvase de 2 mL del extracto a un tubo eppendorf®
Centrifugación 5 minutos a 5000 r.p.m.
Trasvase del sobrenadante a otro tubo eppendorf® y centrifugación 20 minutos a 13000 rpm
Decantación del sobrenadante y resuspensión del precipitado en 461 μ L de tampón CTAB 2% (Tris 1M, EDTA 20 mM, NaCl 1,4M, pH 8, CTAB 2%). En el momento de su utilización, añadir 0,2% de mercaptoetanol
Incubación al baño María a 65°C durante 20 segundos
Adición de cloroformo V/V. Agitar
Centrifugación durante 10 minutos a 11000 r.p.m. a temperatura ambiente (20°C)
Tomar la fase superior y traspasarla a otro tubo eppendorf® de 2 mL
Adición de isopropanol V/V, mezclar y dejar enfriar 30 minutos a -20°C
Centrifugación durante 20 minutos a 12000 r.p.m. en frío a 4°C
Decantación del isopropanol. Lavado del precipitado de ADN con 1 mL de etanol al 70%
Centrifugación 5 minutos a 12000 r.p.m. y decantación del etanol. Posteriormente dejar secar el precipitado
Resuspensión del precipitado en 50 μ L de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA)
Conservación a -20°C

2.2.- Identificación molecular

La PCR es una técnica actualmente extendida y empleada en la mayoría de laboratorios en el campo de la biología molecular para amplificar y detectar secuencias de ADN. Existen diferentes técnicas que se aplican en función del material del que se disponga de partida, principalmente de la cantidad y concentración de ADN que se tenga en el momento de comenzar el análisis.

En el caso de la identificación de fitoplasmas en encinas, la cantidad de propágulo inicial se sospecha bajo, motivo por el cual se optó por los dos métodos que resultaban más sensibles que la PCR convencional: la PCR anidada (Nested-PCR) y la PCR a tiempo real (qPCR).

PCR Anidada (Nested-PCR)

La PCR anidada es una técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es empleado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que hibridan dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque se reducen significativamente las posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores. Como inconveniente, presenta un mayor riesgo de contaminación de las muestras, ya que existe una mayor manipulación de las mismas.

La PCR anidada fue empleada para la detección específica de fitoplasmas siguiendo el método de Garcia-Chapa *et al.* (2003a).

En un primer paso, se emplearon los cebadores universales para la detección de fitoplasmas, P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996) (Tabla 3.3), localizados en los genes 16S rDNA y 23S rDNA, respectivamente, con la intención de amplificar un fragmento de 1800 pares de bases (bp) de longitud. Sus secuencias son las siguientes:

Tabla 3.3.- Cebadores empleados para la identificación de fitoplasmas.

P1 (directo):	5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'
P7 (inverso):	5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Esta primera amplificación fue llevada a cabo en tubos de PCR de 0,2 mL, en un volumen total de 20 µl de la siguiente mezcla (Tabla 3.4):

Tabla 3.4.- Mix de PCR la primera amplificación para la identificación del agente causal de las tumoraciones en encinas.

Cebadores P1-P7	2 µl de cada uno [0,25 µM]
dNTPs	5 µl [1,25 mM]
MgCl₂	6 µl [10 mM]
GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, USA)	0,15 µl [5 Ud/µl]
Tampón LAB	2 µl [10x]
DNA	2 µl [5-10 ng]
H₂O bidestilada	hasta 20 µl

El segundo paso fue llevado a cabo con los cebadores universales r16f2/r2n (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican un fragmento del gen 16rDNA de alrededor de 1200 pb. Sus secuencias son las siguientes (Tabla 3.5):

Tabla 3.5.- Cebadores universales empleados para la identificación de fitoplasmas en la segunda amplificación de la PCR anidada.

R16F2 (directo)	5´- ACGACTGCTGCTAAGACTGG- 3´
R16R2 (inverso)	5´-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3´

La reacción de amplificación se llevó a cabo en una termociclador Techne (Genius) con una etapa inicial de desnaturalización de 90 segundos a 92°C seguida de 30 ciclos que consistían en una desnaturalización inicial de 45 segundos a 92°C, hibridación de 45 segundos a 55°C y una elongación de 1 minuto y 45 segundos a 72°C. La extensión final fue a 72°C durante 5 minutos.

El segundo mix de amplificación contenía los mismos componentes, pero una diferente concentración de cebadores (0,375 µM de cada). Para este segundo paso se emplearon, como ADN molde, 2 µL de dilución 1:50 del primer producto de amplificación.

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis (Fig. 3.9) en un gel al 1,5% de D-1 agarosa (Pronadisa, Madrid, España), con un tampón estándar TAE 1X (EDTA Tris acetato) (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

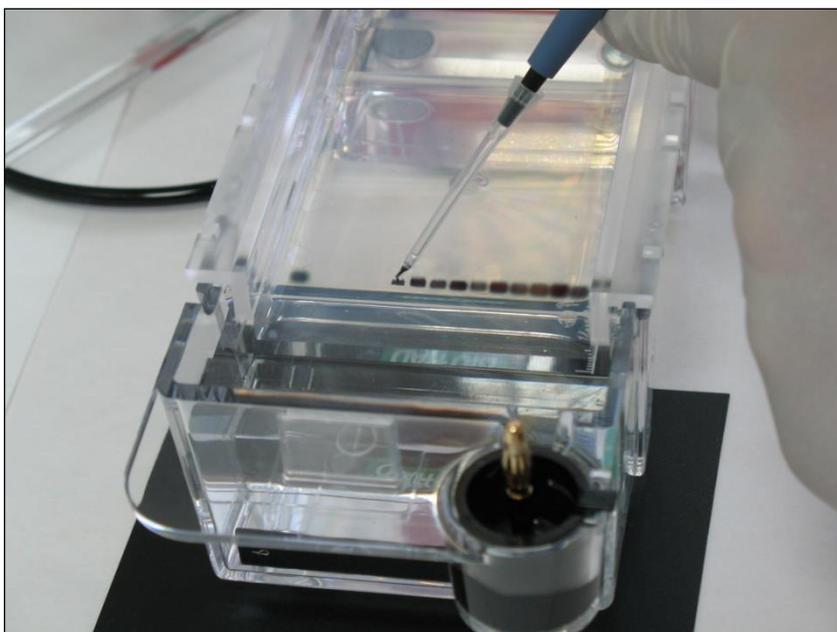


Figura 3.9.- Carga del gel de agarosa para la electroforesis.

PCR a Tiempo Real

La PCR a tiempo real (también llamada PCR cuantitativa) tiene como principal objetivo la detección y cuantificación de las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de marcadores fluorescentes en la reacción. De este modo el incremento en la cantidad de producto de amplificación se traduce en un incremento de la fluorescencia emitida en cada ciclo. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de ADN, la técnica asegura una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia, características necesarias en el la detección de fitoplasmas.

Para realizar el seguimiento de los productos amplificados se emplean sistemas basados en marcadores fluorescentes. Estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes, no específicos y específicos.

Entre los métodos específicos destacan las sondas TaqMan, que han sido las empleadas en este trabajo para la detección del fitoplasma. Tienen en común con los primeros la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados, aunque parten de principios distintos.

En este caso se parte de una cadena monocatenaria. En el momento del alineamiento se hibridará una sonda que tiene un fluoróforo que emite fluorescencia a lo largo de la reacción. Sin embargo, al otro lado de la cadena de la sonda hay anexa una molécula receptora (quencher) con un espectro de absorción igual que el espectro de emisión del fluoróforo, por lo que ésta estará robando electrones del mismo y no dejará que muestre señal alguna.

En esta reacción también hay una polimerasa especial capaz de polimerizar a altas temperaturas y es capaz de hidrolizar la sonda, de modo que el fluoróforo y la molécula receptora se alejarán lo suficiente como para que el fluoróforo pueda emitir fluorescencia (Fig. 3.10), y ésta pueda ser detectada por el equipo.

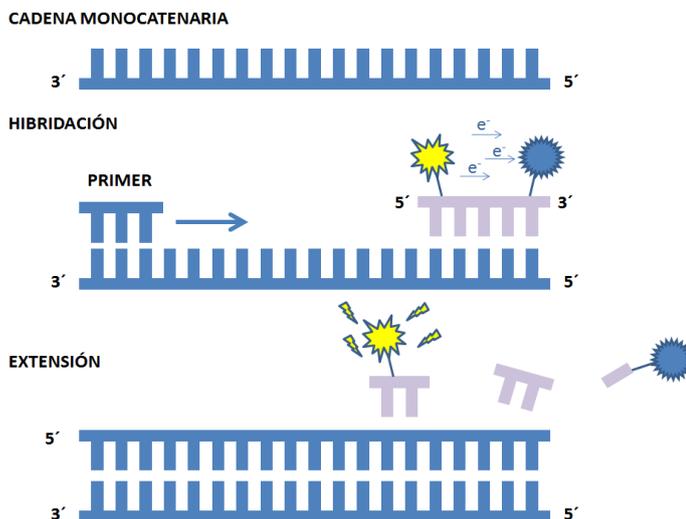


Figura 3.10.- Esquema de funcionamiento de una PCR cuantitativa (PCR a Tiempo Real) con las sondas TaqMan.

Este método es muy fiable, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y por lo tanto no habrá emisión de fluorescencia. Por ello la especificidad es muy alta. El principal inconveniente es que se precisa el diseño de una sonda para cada organismo a analizar, pero en el caso que nos compete, esta sonda ya estaba diseñada por Christensen *et al.* (2004).

La amplificación mediante PCR a tiempo real fue llevado a cabo con el método de Christensen *et al.* (2004), usando la sonda TaqMan para el gen 16S del ARNr. Sus secuencias son las siguientes (Tabla 3.6):

Tabla 3.6.- Secuencias de los cebadores y la sonda TaqMan empleados para la identificación del agente causal de las malformaciones tumorales a través de una PCR a tiempo real.

Cebador directo:	5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'
Cebador inverso:	5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'
Sonda TaqMan	5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

La amplificación fue llevada en una placa de PCR, en un volumen total de 25 μ l de la siguiente mezcla (Tabla 3.7):

Tabla 3.7.- Mezcla empleada para la identificación del agente causal de las malformaciones tumorales en España a partir de una PCR a tiempo real.

	Concentración final	Volumen (μL) final en cada pocillo
Cebador directo	300 nM	0,86
Cebador inverso	300 nM	0,86
Sonda	100 nM	1,15
Master MIX PCR	1X	14,38
H₂O bidestilada		5,75
ADN	5-10 ng/ μ L	2

La composición de la reacción (25 μ L) consistió en una Master mix PCR 1X (Applied Biosystems), 300 μ M de cebador directo, 300 μ M de cebador inverso, 100 μ M de sonda y 2 μ L de molde de ADN, llevando hasta 25 μ L con agua.

En el trabajo de PCR en tiempo real de Christensen *et al.* (2004), se utilizaron 900 nM de cebador inverso. Sin embargo en una publicación posterior este valor se redujo a 300 nM (Christensen et al., 2013), cifra que se ha empleado para hacer los trabajos de esta tesis.

Todas las muestras se analizaron por duplicado. La amplificación se realiza mediante una etapa inicial de desnaturalización de 3 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Para la amplificación y visualización de resultados se empleó un termociclador StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Los productos de la PCR fueron secuenciados por una empresa externa. Se comprobó la calidad de las secuencias, y se editaron los extremos con baja calidad. Se buscaron homologías en la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los datos de las secuencias se analizaron con el programa de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de E.E.U.U (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con la PCR a tiempo real fueron positivos débiles (Fig. 3.11), hecho frecuente en este tipo de análisis, debido a la baja concentración de ADN de fitoplasma presente en las muestras.

Los valores de corte son expresados como “Threshold cycle” (Ct), que se refiere al primer incremento significativo de fluorescencia que excede el ruido de fondo y cruza la línea umbral. Los valores de Ct son analizados para determinar la presencia o ausencia del ADN diana. El control positivo dio señal a los 22 ciclos, mientras que las muestras obtenidas de las encinas sintomáticas dieron señal a partir de los 32 ciclos.

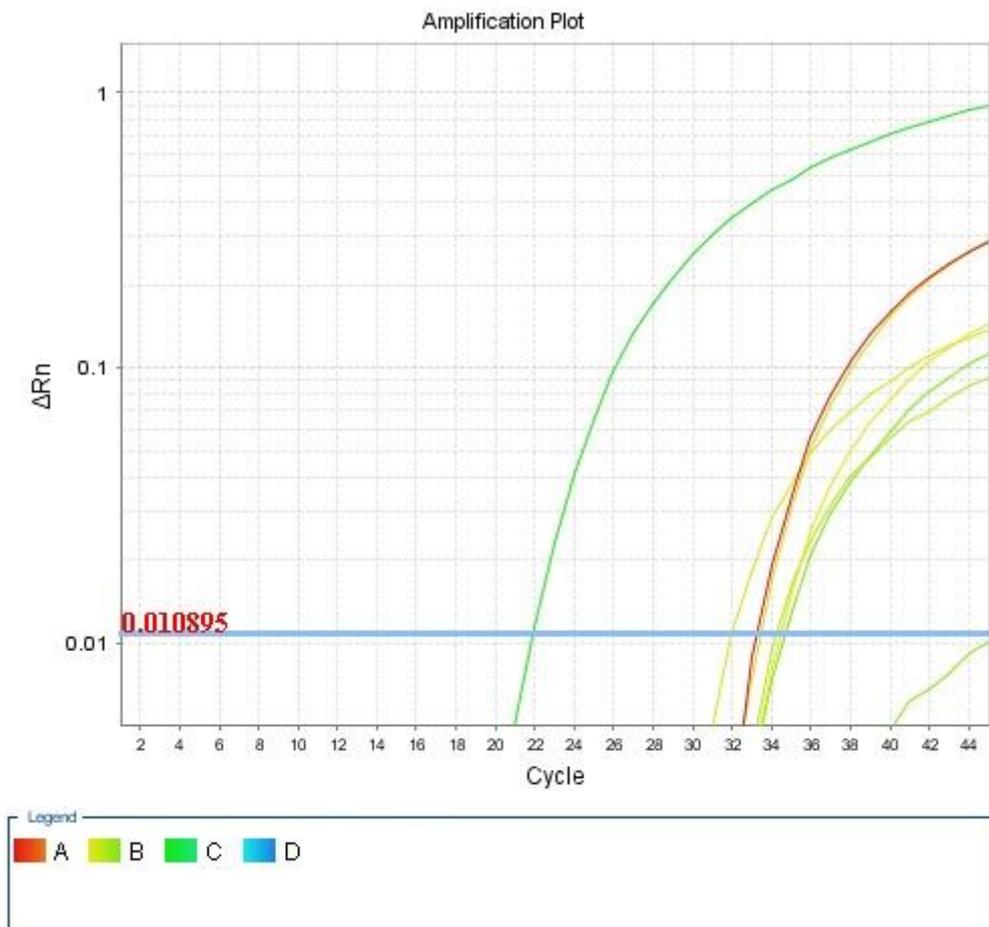


Figura 3.11.- Diagrama de amplificación de la fluorescencia normalizada (Rn) de muestras de encinas sintomáticas. A: Muestras de brotes; B: Muestras de nervios de hojas y tallos; C: control positivo; D: control negativo.

Los análisis moleculares con PCR cuantitativa se realizaron en primavera de 2011, primavera de 2012 y primavera de 2013 para comprobar los resultados, con diferentes muestras de raíz, yema apical y corteza en primavera de 2011, con muestras de nervio y floema en primavera de 2012 y con muestras de raíz, de brotes de tallo y de rebrote en primavera de 2013. En 10 de estas muestras se obtuvieron resultados positivos, y los controles negativos obtenidos de planta de vivero no contaminada no dieron señal, lo que permitió continuar los análisis hacia la identificación de un fitoplama como agente causal de la enfermedad. Sin embargo, debido a la debilidad de los positivos (altas Ct), requirió la confirmación de esta hipótesis mediante la técnica de PCR anidada.

Para ello se realizaron análisis mediante PCR anidada en un total de 12 muestras sintomáticas y dos testigos negativos. De todas ellas se obtuvieron 11 positivos, visualizando la banda esperada de 1200bp, sin productos en los controles negativos (Fig. 3.12).

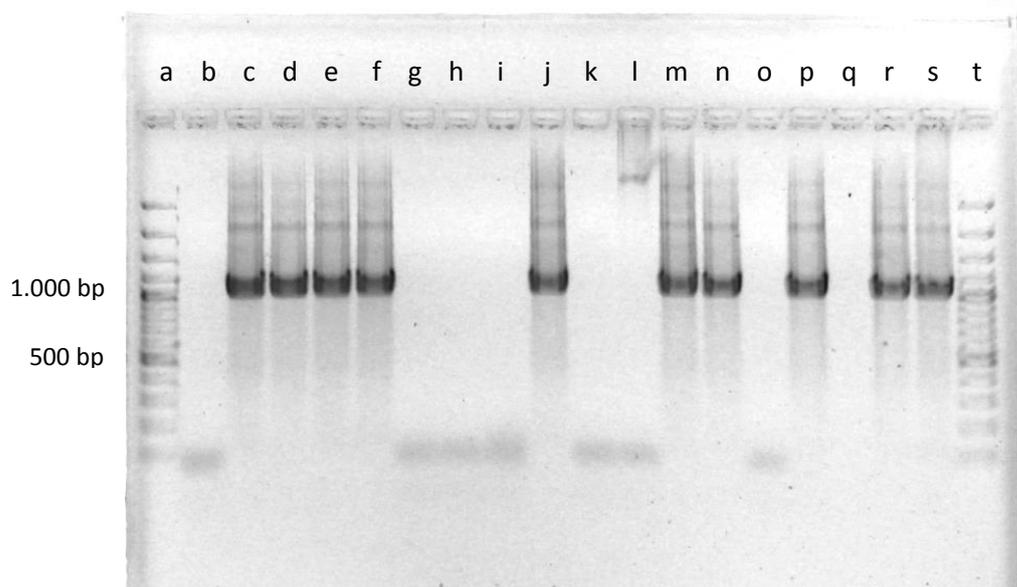


Figura 3.12.- Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) del producto final de la PCR anidada. Muestras: Marcador de peso molecular (a, t); Peciolo (b, f, g, h); brotes apicales (c); floema (d, e, i, j, k); nervadura (l); brotes (m, n, o, p); control positivo (r, s); control negativo (q).

El control positivo mostró una banda de idéntico peso molecular. Los resultados, por lo tanto, fueron también positivos, confirmando la relación entre un fitoplasma y las malformaciones evidentes.

Por lo tanto, empleando los dos tipos de PCR, PCR anidada y PCR a tiempo real, llevadas a cabo con cebadores que amplifican secuencias del gen ribosómico 16S conocidas en todos los fitoplasmas, se obtuvieron resultados positivos (Tabla 3.8), mientras que no se detectaron productos de PCR en los controles negativos. Se puede afirmar entonces que un fitoplasma está involucrado en el desarrollo de esta enfermedad.

Tabla 3.8.- Resultados de las muestras analizadas mediante PCR anidada y PCR a tiempo real en diferentes periodos vegetativos (primavera y otoño) y diferentes años (2011,2012 y 2013).(-): negativo; (+): positivo débil; (++): positivo; (+++): positivo intenso.

ESTACIÓN	AÑO	PROCEDENCIA	MUESTRA	COMENTARIOS	TIPO ANÁLISIS	RESULTADO
Primavera	2011	Vivero Zaragoza	Raíz	Testigo negativo	qPCR y Nested-PCR	-
Primavera	2011	Plantación	Yema apical	Sintomática	qPCR	+
Primavera	2011	Plantación	Yema apical	Sintomática	Nested-PCR	+
Primavera	2011	Plantación	Pecíolo	Sintomática	Nested-PCR	+
Primavera	2011	Plantación	Floema tallo	Sintomática	Nested-PCR	+
Primavera	2011	Plantación	Yema apical	Sintomática	Nested-PCR	+
Primavera	2011	Plantación	Corteza	Sintomática	qPCR	+
Primavera	2011	Plantación	Yema apical	Sintomática	qPCR	+
Primavera	2012	Plantación	Nervio hoja	Sintomática	qPCR	+
Primavera	2012	Plantación	Floema tallo	Sintomática	qPCR	+
Otoño	2012	Vivero	Yema apical	Sintomática	Nested-PCR	+++
Otoño	2012	Vivero	Yema apical	Sintomática	Nested-PCR	+++
Primavera	2013	Vivero Zaragoza	Raíz	Testigo negativo	qPCR y Nested-PCR	-
Primavera	2013	Plantación	Brotos tallo	Sintomática	qPCR y Nested-PCR	++
Primavera	2013	Plantación	Brotos tallo	Sintomática	qPCR y Nested-PCR	++
Primavera	2013	Plantación	Brotos tallo	Sintomática	qPCR y Nested-PCR	++
Primavera	2013	Vivero	Rebrote	Sintomática	qPCR y Nested-PCR	++
Primavera	2013	Vivero	Rebrote	Sintomática	Nested-PCR	++
Primavera	2013	Vivero	Rebrote	Sintomática	Nested-PCR	-

Finalmente, se envió a secuenciar una de las dos muestras procesadas mediante PCR anidada que presentaron una intensidad de banda más intensa. Se trata de una muestra recolectada y procesada en otoño de 2012, procedente de yemas apicales. La secuencia (Fig. 3.13) fue publicada en GenBank con el número de acceso KJ415258.1.

```

ORIGIN
  1 atgctgagag atgggcttgc ggcacattag ttagtgtgta aggtaatggc ttaccaagac
  61 tatgatgtgt agctggactg agaggttgaa cgccacatt gggactgaga tacggcccaa
 121 actcctacgg gaggcagcag taaggaattt tcggcaatgg aggaaactct gaccgagcaa
 181 cgccgcgtga acgatgaagt atttaggtac gtaaagtctt ttattataag aagaaaaaat
 241 gatggaaaaa tcattctgac ggtatttaat gaataagccc cggctaacta tgtgccagca
 301 gctgcggtaa tacatggggg gcaagcgta tccggattta ttgggcgtaa aggggtcgtgta
 361 ggccggtaaa taagtctatg gtataagttc aacgctaac gttgtgatc tatagaaact
 421 gtttgactag agttggatag aggcaagtgg aattccatgt gtagcggtaa aatgctgaaa
 481 tatatggagg aacaccagta gcgaaggcgg cttgctgggt cttactgac gctgaggcac
 541 gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata ccttggtagt ccacgccgta aacgatgagt
 601 actaagtgtt ggggttaaacc agtgcgaag ttaacacatt aagtactccg cctgagtagt
 661 acgtacgcaa gtatgaaact taaaggaatt gacgggactc cgacaagcg gtggatcatg
 721 ttgtttaatt cgaagataca cgaaaaacct taccaggtct tgacatact tgcaaaagcta
 781 tagaaatata gtggangnta tcangntac aggtgggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt
 841 cgtgagatgn tggntaaagt cccgcaacga gcgcaacctt taccactagt naccntcatt
 901 tagttgggca ctttagtgag actgccaatg ataaantgga ggaaggnggg gnntacntca
 961 aatcatcntg ccc
//
    
```

Figura 3.132.- Secuencia del resultado de la PCR anidada obtenida a partir de muestras de yemas apicales en otoño de 2012.

La comparación por análisis BLAST con secuencias de otros fitoplasmas en la base de datos de GenBank mostró una elevada similitud con fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrX. Concretamente, con un 100% de cobertura y un 98,6% de porcentaje de identidad con los números de acceso LT746087.1, LT746086.1, KJ415258.1 (entre otros) correspondientes a secuencias de *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Fig. 3.14).

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate Trzebnica	1742	1742	100%	0.0	98.46%	LT746087.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate Kordia II 14	1742	1742	100%	0.0	98.46%	LT746086.1
✓	'Quercus ilex' phytoplasma clone Qis1 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	100.00%	KJ415258.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum strain P167 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	KJ001833.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate P166 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	KF932303.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum strain T164-F2n 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	KF739404.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum strain T162-F2n 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	KF739403.1
✓	Iranian pear phytoplasma SP1S 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	KC902808.1
✓	Plum leptonecrosis phytoplasma strain LnP 16S ribosomal RNA gene partial sequence: 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and rRNA	1742	1742	100%	0.0	98.46%	JQ868450.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate OzPr 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	HM149268.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate Sok 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	HM149267.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate Reg 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	HM149266.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate RedH 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	HM149265.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate AU5 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1742	1742	100%	0.0	98.46%	HM149264.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate ESFY-3237	1742	1742	100%	0.0	98.46%	AM933140.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene strain ESFY-422	1742	1742	100%	0.0	98.46%	AJ575109.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene and rRNA-ile gene for transfer RNA-ile strain ESFY-142	1742	1742	100%	0.0	98.46%	AJ575108.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene rRNA-ile gene and 23S rRNA gene (partial) strain ESFY-215	1742	1742	100%	0.0	98.46%	AJ575105.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene rRNA-ile gene and 23S rRNA gene (partial) strain ESFY-G2	1742	1742	100%	0.0	98.46%	AJ542545.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate ESFY-1112	1738	1738	100%	0.0	98.36%	AM933141.1
✓	'Prunus armeniaca' apple proliferation phytoplasma isolate ESFY-Ch 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic space	1736	1736	100%	0.0	98.36%	MG748694.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate ESFY-F2nR2-c2_SP6_Plate_1_8 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1736	1736	100%	0.0	98.36%	MH279543.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate ESFY_Tun 16S ribosomal RNA gene partial sequence 16S-23S ribosomal RNA intergenic space	1736	1736	100%	0.0	98.36%	JF730310.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum isolate EO 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1736	1736	100%	0.0	98.36%	HM149262.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene ITS1 and partial 23S rRNA gene isolate ESFY-2102	1736	1736	100%	0.0	98.36%	AM933142.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene strain ESFY-377	1736	1736	100%	0.0	98.36%	AJ575111.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene strain ESFY-379	1736	1736	100%	0.0	98.36%	AJ575110.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene rRNA-ile gene and 23S rRNA gene (partial) strain ESFY-173	1736	1736	100%	0.0	98.36%	AJ575106.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene rRNA-ile gene and 23S rRNA gene (partial) strain ESFY-G1	1736	1736	100%	0.0	98.36%	AJ542544.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S rRNA gene (partial) rRNA-ile gene and 23S rRNA gene (partial)	1735	1735	100%	0.0	98.25%	AJ575107.1
✓	Candidatus Phytoplasma prunorum 16S ribosomal RNA gene partial sequence	1731	1731	100%	0.0	98.25%	AY688362.1

Figura 3.14.- Resultado del BLAST en GenBank de la secuencia obtenida en el presente trabajo, donde destaca el elevado porcentaje de identidad con otros fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrX (Julio 2020).

En este sentido, una vez que el fitoplasma ha sido identificado como el agente causante de la enfermedad y sabiendo que pertenece al grupo 16SrX, los trabajos futuros deben dirigirse hacia la identificación del transmisor para controlar la enfermedad. En las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) se han realizado los estudios preliminares sobre mecanismos de transmisión (obtención de planta a partir de bellotas procedentes de ramas sintomáticas, ensayos de transmisión mecánica, colocación de planta sana con planta sintomática contaminada con *Kermes ilicis* ...), aunque los resultados no han sido concluyentes, por lo que los trabajos deben de continuarse en campo más orientados hacia la identificación molecular del fitoplasma en insectos vectores.

La alta densidad de las plantaciones de encinas puede haber favorecido también al aumento de poblaciones de estos insectos vectores, lo que favorecería asimismo el incremento de tumores en las áreas forestales. Sin embargo, se necesita más investigación sobre la distribución e incidencia de esta enfermedad, prestando especial atención a las áreas forestales. Los agentes de protección de la naturaleza que trabajan en las áreas más afectadas (estribaciones de la cordillera del Sistema Ibérico) están alarmados por la creciente incidencia de tumores en los bosques.

Se han detectado fitoplasmas pertenecientes al grupo 16Sr-X en *Corylus avellana* L., *Fraxinus excelsior* L., *Rosa canina* L., *Celtis australis* L., *Crataegus monogyna* Jack., *Quercus robur* L., *Quercus rubra* L., *Carpinus betulus* L. y *Convolvulus arvensis* L. (Schneider *et al.*, 1997; Seemüller y Schneider, 2004), especies que podrían estar presentes en el entorno de plantaciones trufas.

Además, se sabe que diferentes especies de *Quercus* son huéspedes de fitoplasmas y desarrollan la enfermedad después de la infección (Marccone *et al.*, 1999; Berges *et al.*, 2000; Seemüller y Schneider, 2004). Sin embargo, la sintomatología descrita no coincide con la observada en *Q. ilex*. Otras malformaciones tumorales similares se han observado en *Quercus*, pero se relacionaron con insectos, principalmente de la familia Cynipidae (Pujade-Villar y Ros-Farré, 1998) o bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* (Wilhelm *et al.*, 1996).

En relación a las posibles formas de transmisión de los fitoplasmas, para los procariontes de la clase Mollicutes, en los que se incluyen los fitoplasmas, suelen ser necesarios los insectos vectores para su transmisión, dispersión y multiplicación. Estos insectos vectores deben alimentarse, además, del floema de la planta ya que, debido al rico contenido en glucosa y fructosa, es el lugar donde se desarrollan los fitoplasmas. Otras formas de transmisión, como las plantas parásitas (cuscuta) o el injerto, no se han planteado en esta tesis, por no realizarse injertos en plantaciones trufas, y no haberse visto plantaciones afectadas con plantas parásitas.

Los fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrX generalmente son transmitidos por insectos de la familia Psyllidae. Un ejemplo es *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1760), que transmite el fitoplasma que causa el deterioro de la pera en España (*Candidatus Phytoplasma pyri*)

(García-Chapa *et al.*, 2005). *Cacopsylla melanoneura* (Foerster, 1848) y *Cacopsylla picta* (Foerster, 1848) propagan el fitoplasma responsable de la enfermedad de proliferación de la manzana (*Candidatus Phytoplasma mali*) (Laviña *et al.*, 2011). Y finalmente, *Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763) transmite el fitoplasma que causa el amarilleamiento de la fruta de hueso europea (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) (Laviña *et al.*, 2004).

Los insectos de la familia Psyllidae que transmiten *Candidatus Phytoplasma mali* y *Candidatus Phytoplasma prunorum* normalmente hibernan en bosques alejados de los huertos, donde se alimentan de árboles forestales. Sin embargo, tan pronto como termina el período de hibernación, regresan a las plantaciones de frutales. Esto mismo podría suceder en las plantaciones truferas, ya que se encuentran en su mayoría rodeadas de áreas forestales en las que abundan las rosáceas, como el escaramujo (*R. canina*), el majuelo (*C. monogyna*), el endrino (*Prunus spinosa* L.), el durillo (*Amelanchier ovalis* Medik.), el serbal (*Sorbus aria* Crantz) entre otros, y de zonas agrícolas en las que abunda la presencia de almendros (*Prunus dulcis* Mill.).

Otros insectos citados por la bibliografía capaces de transmitir fitoplasmas son del orden hemíptera y suborden homóptera. Es común entre truficultores la creencia de que *Kermes* sp. está relacionado con la aparición de esta sintomatología. Sin embargo, debido a su poca movilidad, así como a la corta vida de los machos móviles (Fig. 3.15), que además son áfagos (Martín Bernal *et al.*, 2002), no se le consideró en un primer momento un buen candidato a ser el vector que esté propagando la enfermedad. Sin embargo, la relación existente entre ambos es cada vez más evidente, siendo muy frecuente la presencia en plantaciones de árboles que presentan tumores que han sufrido años anteriores ataques de *Kermes* sp. Además, las condiciones de densidad y de monocultivo de las plantaciones truferas, nos hace tener en cuenta esta hipótesis.



Figura 3.15.- Machos de *Kermes ilicis* (blanco) sobre encina.

En general, las habilidades de dispersión de las cochinillas son limitadas (Moran *et al.*, 1982; Sullivan y Hosking, 1995). Las hembras adultas de las cochinillas son sésiles. Una vez que se fijan a la planta y comienzan a alimentarse pierden movilidad, por lo que la dispersión de estas especies se limita a las primeras etapas de ninfas. Algunas de las ninfas permanecen en la planta donde han eclosionado, pero otras emplean sus filamentos de cera para moverse dejándose llevar por las corrientes de aire (Moran *et al.*, 1982). Esta aleatorización hace que en caso de masas naturales en las que existen barreras físicas entre encinas (otras especies forestales, elevaciones en el terreno, construcciones...) la dispersión de las cochinillas sea más complicada que en el caso de plantaciones truferas, en las que existe una masa continua mono-específica de encinas. Esto convierte a *Kermes* sp. en un probable agente dispersor de la enfermedad.

Si se confirmara la relación de este insecto con el fitoplasma, sería necesario profundizar en los posibles tratamientos a aplicar para el control de esta especie en plantaciones truferas. En la actualidad en la página web del ministerio no existe ningún fitosanitario autorizado para cochinillas en especies forestales, lo que limita notablemente su control. Se han realizado experiencias con resultados positivos con jabón potásico (Romeo, 2004) y se han iniciado trabajos con aceite de parafina como métodos alternativos de control.

Sin embargo, por el momento, y hasta que se tenga más información sobre la etiología y transmisión de esta enfermedad, se aconseja a los truficultores y gestores aplicar el concepto de prevención. Existen diferentes formas de frenar la dispersión de los fitoplasmas, aunque no todas son aplicables a plantaciones truferas.

- En primer lugar, el uso de variedades resistentes, solución que no es factible actualmente debido a la dificultad de identificar los genes de resistencia.
- La segunda solución es a través del control de insectos vectores. Ésta se presenta como la mejor solución, pero para ello es preciso conocer el o los insectos vectores que están transmitiendo la enfermedad. Si estos insectos fueran monófagos la solución sería relativamente sencilla, hecho que se complicaría lógicamente si fueran polífagos, ya que habría que conocer las diferentes plantas huésped y tratar contra el insecto en el momento preciso.
- La tercera alternativa, recomendada siempre en caso de problemas fitopatológicos, es la erradicación de las plantas infectadas con la intención de disminuir la cantidad de inóculo en la parcela de cultivo o en la zona en general.
- Se aconseja a los truficultores y gestores mantener una correcta higiene de las herramientas de trabajo, con la intención de minimizar riesgos de contagio mecánico a la hora de realizar trabajos culturales. Aunque en este caso nunca se haya reconocido como una forma de transmisión efectiva de fitoplasmas.

- Y, por último y el más importante, es el empleo de material sano, sabiendo identificar en vivero la enfermedad y no adquiriendo plantas infectadas. Esto parece un hecho evidente, aunque se han detectado plantas recién plantadas en campo que presentaban tumores en el tallo. En la mayoría de los casos, las plantas sobreviven, pero manifiestan una marcada clorosis, y un debilitamiento generalizado, pudiendo favorecer la entrada de otras enfermedades, así como el ataque de plagas secundarias como insectos perforadores. En este sentido, se recomienda la eliminación de las malezas en una franja de 10 a 15 metros alrededor de los viveros (Fig. 3.16) de producción de planta micorrizada para evitar que sirva de refugio de vectores (Velázquez-Valle *et al.*, 2014).

Una vez que se ha descrito el agente causal de la enfermedad, los investigadores, los recolectores de trufas y las administraciones deben estar alerta ante la posible aparición de nuevos brotes de este síndrome, no solo en las zonas agrícolas, sino también en los bosques. Se deben continuar los estudios para aprender sobre la etiología y la propagación de esta enfermedad para evitar que esta epifitía pueda poner en peligro las quercíneas del Mediterráneo.



Figura 3.16.- Plantas adventicias en el entorno de un invernadero donde se produce planta micorrizada con trufa negra. Estas hierbas pueden suponer un refugio para los insectos vectores del fitoplasma.

Es importante, para frenar esta enfermedad, la identificación temprana en campo. Las infecciones de fitoplasmas pueden transcurrir de forma latente en cultivos perennes y de ciclo largo (Aljanabi *et al.*, 2001). En estos hospedantes los fitoplasmas se multiplican y se mueven a través de la planta durante el periodo de incubación, donde los mismos pueden ser detectados

en plantas asintomáticas (Constable *et al.*, 2003). La manifestación de los síntomas puede ocurrir cuando la planta infectada está bajo condiciones de cultivo desfavorable u otras condiciones de estrés (Tran-Nguyen *et al.*, 2000). En este sentido, las técnicas moleculares pueden ser una ayuda para la detección temprana de este organismo, pudiendo ser introducidas en los controles rutinarios de identificación temprana de agentes patógenos por parte de la administración, con la intención de evitar la propagación de esta enfermedad desde la fase de vivero.

El hecho de que se haya identificado un fitoplasma como organismo causal de esta enfermedad tiene consecuencias indirectas relevantes para la truficultura, ya que los trabajos deben continuar en dirección al insecto vector. El establecimiento de una plantación trufera requiere un importante desembolso de capital inicial (Quintana, 2007; Reyna *et al.*, 2002). La aparición de una enfermedad capaz de debilitar o incluso matar los árboles, como en el caso de estas malformaciones tumorales, puede poner en peligro la rentabilidad de un cultivo a priori rentable.

En este caso, la pérdida económica no solo viene causada por la merma en la producción debida al debilitamiento o a la muerte de los pies afectados. Una complicación derivada de esta enfermedad es la rotura de ramas (y en los casos más alarmantes, del tronco principal), cuando hay condiciones climáticas adversas, como fuertes vientos o intensas nevadas (Fig. 3.17).



Figura 3.17.- Rama rota en una encina que presenta tumores tras una intensa nevada en la Comarca Gúdar-Javalambre (Teruel), en febrero de 2017.

Además, el principal problema de la aparición de una enfermedad causada por un fitoplasma es la falta de medidas curativas cuando se establece en una plantación. Debido a las características intrínsecas del organismo, ningún tratamiento fitosanitario es capaz de controlar actualmente a los fitoplasmas, como sucede también en el caso de los virus, debiendo centrar los esfuerzos en la prevención.

Capítulo 4

Biología y ecología del escarabajo de la trufa (*Leiodes cinnamomeus* Panzer)



INTRODUCCIÓN

La tecnificación e intensificación del cultivo de trufa, principalmente los aportes hídricos realizados en momentos de escasez de precipitaciones, está favoreciendo la regularidad en la producción de carpóforos, mitigando los años de carencia de producción debidos a la baja pluviometría. Esta regularidad en la producción lleva asociado inevitablemente el aumento de plagas y enfermedades relacionadas con los cuerpos fructíferos. Entre ellas destaca el coleóptero *Leiodes cinnamomeus* (Panzer, 1793), conocido como “escarabajo de la trufa” (Martín-Santafé *et al.*, 2014).

El aumento de las poblaciones de *L. cinnamomeus* en las plantaciones truferas está siendo un problema hoy en día en el sector. En trabajos realizados por este equipo se han observado afecciones de hasta al 64% de las trufas en plantaciones con una elevada producción (>100kg/ha) (datos no publicados).

Se trata de un insecto que ha existido tradicionalmente asociado a los cuerpos fructíferos de *Tuber melanosporum* Vittad. (Fig. 4.1) y *Tuber brumale* Vittad., pero no a *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng (Arzone, 1971; Callot, 1999; Paccioni y Lalli, 1990; Oliver *et al.*, 1996; Reyna, 2012). Ya en el S.XIX se hace referencia a *L. cinnamomeus* como un dispersador de esporas necesario para la continuación de la especie (Lindley, 1845). Sin embargo, hoy en día, aunque este papel sigue siendo fundamental en poblaciones silvestres, en el caso de las plantaciones truferas con los trabajos culturales que se llevan a cabo (principalmente con el aporte de esporas a través de los nidos), este papel dispersador no es imprescindible de cara a la propia producción trufera, aunque sí que puede serlo desde el punto de vista de la diversidad genética.

Actualmente existe un desconocimiento sobre la biología de este insecto, lo que dificulta la consecución de medidas de control eficaces para esta plaga. Un ejemplo de esta ignorancia es la fecha de emergencia de los adultos. Los trabajos desarrollados por Arzone (1970) en Italia indican la segunda semana de noviembre como fecha de comienzo de la emergencia de adultos, mientras que los estudios desarrollados por Pérez-Andueza (2015a) en Soria apuntan que este hecho se da a mediados del mes de septiembre.

Por ello, en la presente tesis doctoral se pretende avanzar en el conocimiento de la biología y el comportamiento de *L. cinnamomeus* en campo, con la intención de prosperar en la generación de un método de control integrado que permita disminuir los niveles poblacionales de este insecto.



Figura 4.1.- Carpóforo de *Tuber melanosporum* parasitado por *Leiodes cinnamomeus*.

Taxonomía, biología, daños y descripción de la especie

La especie micófaga *L. cinnamomeus* pertenece al orden Coleoptera, y a la familia Leiodidae. Esta familia es relativamente grande y bastante variable (Peck *et al.* 2020) en cuanto a número de segmentos de las antenas y tamaño de los mismos, tamaño o forma del pronoto. El género *Leiodes* (Latreille, 1797) presenta una distribución mundial según Newton (1998). En la región paleártica aparece representado por 121 especies, de las cuales 63 se localizan en Europa (Perreau, 2006). En la península ibérica hay descritas actualmente 11 de ellas (Sáez-Bolaño *et al.*, 2012), aunque dada la diferencia con las 29 descritas en Francia (Perreau, 2004) se cree que este género no ha sido suficientemente estudiado en España. La mayoría de larvas y adultos de este género se conocen como asociados a hongos hipogeos, incluyendo especies de trufas (Baranowski, 1993; Cooter, 1996).

Su presencia en los cuerpos fructíferos de trufa negra ha sido documentada por varios autores (Arzone, 1971; Pacioni, 1989; Bratek *et al.*, 1992; Callot, 1999; Barriuso *et al.*, 2012; Martin-Santafé *et al.*, 2014), así como en *Tuber magnatum* (Arzone, 1971). Sin embargo, la bibliografía sobre este micófago es escasa. Los estudios más detallados que contienen información sobre su ecología y su morfología se remontan a la década de 1970 (Arzone, 1970; 1971). Incluso la ubicación sistemática del género y la especie también ha sido complicada de realizar, habiendo quedado resuelta en 2010 por Halliday y Majka.

Como características principales, tiene el cuerpo cilíndrico, y puede alcanzar un tamaño comprendido entre los 4 y 6 mm de longitud. Generalmente su coloración es marrón, pudiendo poseer también una tonalidad rojiza o negruzca (Arzone, 1970).

Existe un claro dimorfismo sexual (Fig. 4.2) en la cual los machos son generalmente de mayor tamaño que las hembras. Sin embargo, las diferencias morfológicas más notorias entre ambos sexos

se centran en las patas posteriores. Los machos poseen un gancho en la parte final del fémur, posiblemente para sujetar a la hembra en el momento de la cópula, y una tibia curvada. Por la otra parte, las hembras carecen de gancho y sus tibias son rectas, por lo que sus patas posteriores son, en general, más débiles que las de los primeros (Arzone, 1970; Hochberg *et al.*, 2003).

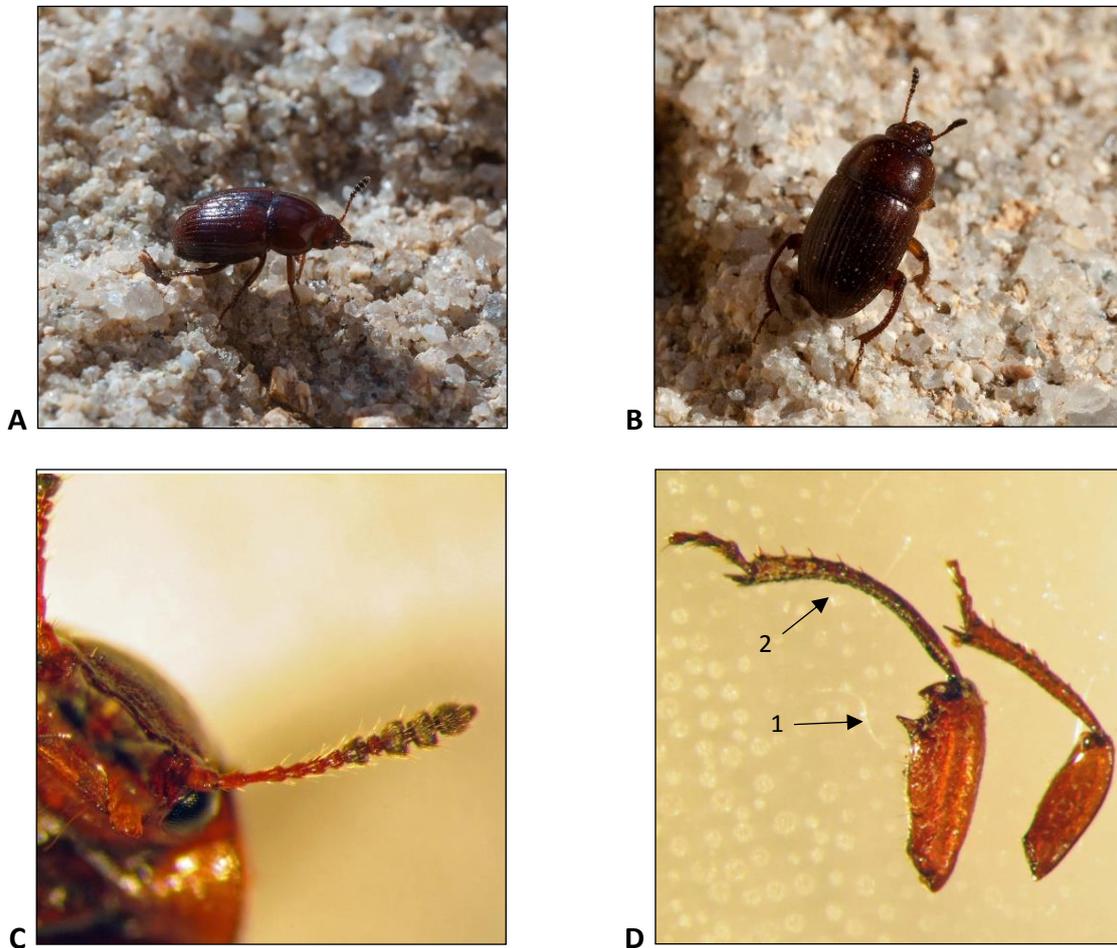


Figura 4.2.- Características de adultos de *Leiodes cinnamomeus*. Hembra (A), macho (B), detalle de antena (C). D: fémur de macho con el gancho (D izda. 1) y tibia curvada (D izda. 2). Fémur de hembra con la tibia recta (D dcha.).

De acuerdo al trabajo desarrollado por Pérez-Andueza (2015a), su desarrollo consta de seis estadios (Tabla 4.1).

Tabla 4.1.- Estadios de *Leiodes cinnamomeus*, duración de cada uno de ellos y fechas en las que tienen lugar en España en función de los estudios realizados por Pérez-Andueza (2015a).

Estadio	Duración	Meses en que tiene lugar
Huevo	12-15 días	Octubre- enero
Larva 1 (micófaga)	8-9 días	Noviembre- marzo
Larva 2 (micófaga)	8-9 días	Noviembre- marzo
Larva 3 (micófaga)	13-14 días	Noviembre- marzo
Larva diapausante o áfaga	8-9 meses	Mediados diciembre- Mediados septiembre
Pupa	20-30 días	Septiembre-noviembre
Imago (Adulto)	35-100 días	Mediados septiembre- Mediados mayo

Los **huevos** (Fig. 4.3 y 4.4) tienen forma redondeada y un tamaño aproximado de 1mm. Cada hembra deposita entre 5 y 10 huevos escalonadamente en las proximidades de las trufas o sobre el peridio de éstas (Arzone, 1971; Newton, 1984; Pérez-Andueza, 2015b).



Figura 4.3.- Huevo de *Leiodes cinnamomeus* entre partículas de suelo.

Las **larvas** (Fig. 4.4) presentan una coloración variable desde el blanco hasta el amarillento, carecen de ojos, poseen potentes mandíbulas para introducirse en la trufa y alimentarse de ella. Tanto los adultos como las larvas son fotofóbicos y pasan la mayor parte de su vida bajo tierra, nutriéndose exclusivamente del cuerpo fructífero y completando su ciclo biológico alrededor del mismo (Arzone, 1970; Newton, 1984). Es característico el comportamiento de la larva, mostrando la peculiaridad de reaccionar a los estímulos externos (sobre todo luminosos) encorvando el abdomen sobre el dorso, hasta tocar la cabeza con la extremidad posterior del cuerpo cuando se produce la

máxima excitación. Al mismo tiempo, la misma larva abre las potentes mandíbulas y permanece en esta postura de defensa mientras perdura el estado de alarma (Arzone, 1970; 1971).

Las larvas presentan distintas fases desde la eclosión de los huevos hasta la entrada en diapausa. Dichas fases se establecen en función del tamaño de la larva (L1, L2 y L3), siendo L1 la de menor tamaño y L3 la mayor (Pérez-Andueza, 2015a).

A causa de la longevidad de los **adultos** y de la oviposición gradual, la colonia presenta imagos y larvas de diversa edad en actividad trófica sobre la misma trufa.

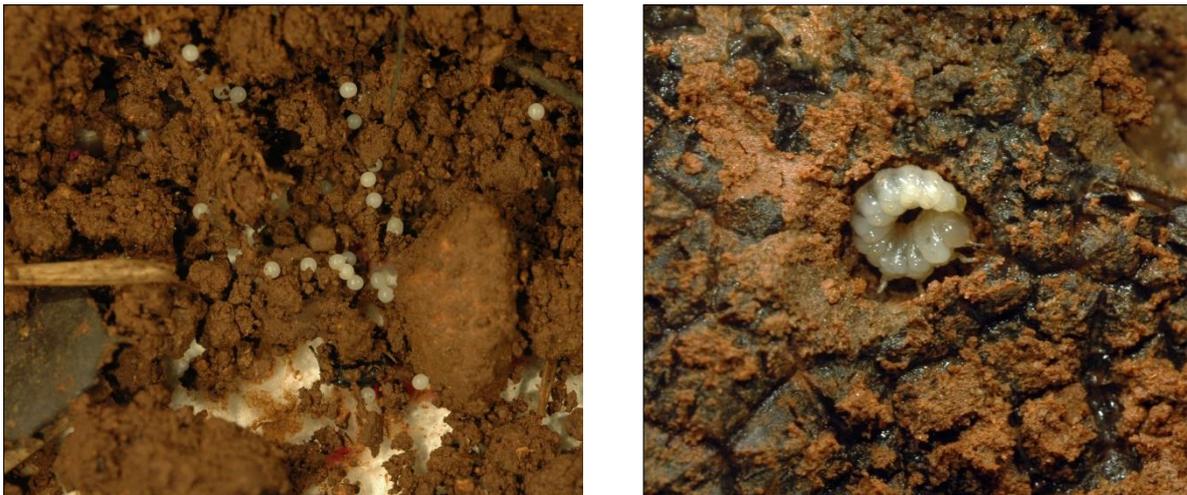


Figura 4.4.- Huevos (Izquierda) y larva (Derecha) de *Leiodes cinnamomeus*.

En cuanto a la cronología, Según Pérez Andueza (2015b), *L. cinnamomeus* es una especie univoltina cuyas poblaciones presentan sucesivas series de adultos que van emergiendo escalonadamente de las pupas tras la larga diapausa estival. Su ciclo biológico está totalmente relacionado con el de *T. melanosporum* (Arzone, 1970). Como se ha comentado anteriormente, alrededor de la trufa se reúne toda una colonia de larvas de todos los estadios e imagos de *L. cinnamomeus*. Los adultos que no se encuentran alimentándose ni apareándose, se concentran en la parte inferior de la trufa (Arzone, 1970).

De acuerdo al trabajo realizado por Pérez-Andueza (2015a) la aparición de los primeros **adultos** se produce hacia mediados de septiembre, después de que las larvas en diapausa hayan salido de ese estado de latencia y pupado en pocos días, y puede extenderse hasta mayo (dependiendo de la trufa disponible). La fase de **pupa** se extiende hasta bien entrado el mes de noviembre.

El inicio de las cópulas y puesta de **huevos** sucede alrededor de octubre. Entre finales de octubre y principios de noviembre aparecen las primeras **larvas (L1)**, pudiéndose encontrar diferentes estadios en el mismo cuerpo fructífero a lo largo de la campaña (Fig. 4.5). A partir de la L3 surge la larva L3 diapausante. La presencia de larvas puede extenderse hasta el mes de marzo, e incluso abril, si la campaña de trufa se alarga.



Figura 4.5.- Diferentes estadios larvarios de *Leiodes cinnamomeus* en un mismo carpóforo.

La **L3 diapausante** suele comenzar en el mes de diciembre, cuando las larvas han completado su desarrollo. En estos casos se desencadenaría una respuesta hormonal que induciría a las larvas a entrar en este estadio latente hasta que las condiciones fueran de nuevo favorables para su actividad. Además, suelen formar un refugio o capullo terroso para entrar en diapausa (Fig. 4.6), donde permanecerán hasta final de agosto-septiembre. Desde la puesta del huevo hasta la formación del capullo terroso puede transcurrir aproximadamente un mes y medio (Pérez-Andueza, 2015a).



Figura 4.6.- Capullo terroso que sirve como refugio a las larvas diapausantes de *Leiodes cinnamomeus*.

Daños ocasionados por *Leiodes cinnamomeus* y control de las poblaciones

Los daños ocasionados son tanto directos por la pérdida de peso y calidad del producto, como indirectos por la pudrición de los cuerpos fructíferos. Esta pudrición causada por microorganismos puede tener su origen en la presencia de los insectos en el interior de los carpóforos, así como en la vía de entrada que supone la presencia de orificios en los cuerpos fructíferos. A esto hay que añadir el rechazo del consumidor y la mala imagen generada al encontrar en las trufas larvas y galerías (Barriuso *et al.*, 2012) con la consiguiente depreciación del producto, disminuyendo su valor comercial. Los daños son producidos principalmente por las larvas (alimentación), aunque también hay daños más leves producidos por adultos, que emplean los carpóforos como refugio.

No existe un estudio de cuantificación de daños en plantaciones truferas, ni trabajos de incidencia actual publicados. Sin embargo, la preocupación del sector de la trufa por la evolución de esta plaga en España es un hecho, y así fue manifestado por la Asociación de Truficultores de Teruel (ATRUTER) a la dirección del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), apoyándose en la realización de una encuesta a los asociados en la que la búsqueda de soluciones para este problema fue la mayor demanda del sector.

Cualquier método de control empleado para disminuir las poblaciones de *L. cinnamomeus* debe de ser compatible con el cultivo de trufa. Es decir, con la planta, el hongo, y en caso de ser posible, siguiendo la condición de cultivo ecológico y sostenible que caracteriza a esta actividad.

En otros cultivos, la utilización de los insecticidas de síntesis ha sido una herramienta necesaria durante décadas, pero el abuso en su utilización ha traído graves consecuencias como residuos que derivan en problemas de toxicidad, degradación del entorno, desarrollo de resistencias, incidencia de plagas secundarias, etc. Por tanto, ha sido necesario buscar otros métodos de lucha más respetuosos.

Los semioquímicos y, particularmente las feromonas y kairomonas de los insectos, constituyen una herramienta fundamental en los programas de detección, monitoreo y control de insectos perjudiciales para cultivos agrícolas, productos almacenados y la salud humana. El empleo de estas sustancias permite:

- detectar los insectos plaga y su abundancia,
- determinar la época de emergencia de adultos,
- escoger las mejores épocas de aplicación de tratamientos,
- obtener mapas de distribución.

Los métodos directos de control de plagas actúan directamente sobre el insecto, pretendiendo disminuir sus poblaciones ya sea a través de la captura masiva, la atracción y muerte o la confusión sexual. Dado que en la actualidad no se ha sintetizado la feromona sexual de *L. cinnamomeus*, se han empleado atrayentes alimenticios para la realización de los trabajos desarrollados en la presente tesis doctoral.

Los estudios realizados acerca de la conducta de *L. cinnamomeus* abren la puerta a la utilización de atrayentes alimentarios. Concretamente Hochberg *et al.* (2003) evaluaron el comportamiento olfativo de este artrópodo en función del sexo y madurez de los carpóforos, determinando que los escarabajos macho no se sienten atraídos por los olores maduros de la trufa, lo que sugiere que son las hembras las que parasitan los cuerpos fructíferos antes de que se alcance un estadio de madurez. Paccioni *et al.* (1991) determinaron que el dimetil sulfuro (DMS) es la molécula que más atracción provoca en *L. cinnamomeus* y Ortiz. *et al.* (2014) midieron su respuesta ante moléculas volátiles de *T. melanosporum*, observando por antenografía que diferentes sustancias son capaces de provocar respuestas, dimetil sulfuro, 1-octen-3-ol y 4-methyl-3-octanol.

El sistema olfativo en insectos juega un papel fundamental para su supervivencia, puesto que está involucrado en aspectos tan importantes como la búsqueda de alimento, de individuos de la misma especie para la reproducción, o de un lugar idóneo donde ovipositar (Visser, 1986; Hansson, 2002).

Como se muestra en el trabajo desarrollado por Navarro-Llopis *et al.* (2020) el trameo masivo con trampas pitfall y emisores de DMS (Fig. 4.7) ha demostrado ser un método de captura eficiente en el control de *L. cinnamomeus* con densidades superiores a 40 trampas/hectárea en parcelas de por lo menos 1ha de superficie. Los resultados de este trabajo realizado en dos campañas consecutivas muestran reducciones del 40% al 47% en el porcentaje de trufas dañadas en el primer y segundo año respectivamente, y un descenso del 47% y 60% en el nivel de daño (galerías/gramo de trufa) en la primera y segunda campaña.

Con estos resultados, el trameo con atrayentes se muestra como un método válido de captura para ser empleado en los trabajos llevados a cabo en esta tesis.



Figura 4.7.- Trampas empleadas en la captura masiva de *Leiodes cinnamomeus* para la disminución de daños en carpóforos.

Sin embargo, los esfuerzos relacionados con el control de esta plaga deben de continuar. Trabajos realizados con el Centre Tecnològic Forestal de Catalunya (CTFC) y la Universidad Autónoma de Barcelona muestran que el control mediante nematodos entomopatógenos parece ser una alternativa a tener en cuenta (Fuentes *et al.*, 2019). Los ensayos fueron realizados con tres cepas autóctonas de nematodos, *Steinernema carpocapsae* (B14), *Steinernema feltiae* (D114) y *Heterorhabditis bacteriophora* (DG46). La especie que mostró una mayor virulencia contra adultos fue *S. carpocapsae*, con una eficacia del 100%. En el caso de las larvas los resultados más positivos se obtuvieron con *S. feltiae* con un 72% de eficacia. Sin embargo, el desarrollo de trabajos en campo es necesario para la consideración de los nematodos entomopatógenos como control biológico de *L. cinnamomeus*.

Aportes de sustrato en plantaciones (“nidos”).

La realización de nidos (también llamados pozos o aportes) (Fig. 4.8) ha sido ampliamente extendida entre los truficultores españoles en la última década.



Figura 4.8.- Práctica de nidos con barrena en una plantación trufera.

Esta técnica es una adaptación de una antigua práctica utilizada por los recolectores de trufas silvestres, que consistía en la aplicación puntual de materia orgánica descompuesta para enmendar el suelo que rodea la trufera (Reyna y Colinas, 2012; García-Barreda *et al.*, 2017). Uno de los aspectos innovadores de la aplicación de nidos en plantaciones truferas es el uso de sustratos a base de turba, que difieren claramente de los suelos minerales en muchas facetas: baja densidad aparente, alta porosidad, alta aireación y buena capacidad de drenaje, alta retención de agua y agua fácilmente disponible, baja conductividad térmica y bajo contenido en nutrientes (Argo, 1998; Abu-Hambeh y

Reeder, 2000; Michel, 2010). Actualmente existen un gran número de sustratos comerciales e incluso aperos para tractores diseñados específicamente para la realización de estos nidos.

Los nidos generalmente se complementan con esporas de trufa, que podrían desempeñar un papel en su reproducción sexual según la hipótesis de Le Tacon *et al.* (2016). De acuerdo a este trabajo, podrían actuar como elementos masculinos en la reproducción sexual. Asimismo, la forma final de las trufas obtenidas con esta técnica es más esférica (García-Barreda *et al.*, 2020) debido a la ausencia de piedras y o cualquier otro tipo de resistencia física a su crecimiento, por lo que su valor en el mercado aumenta.

Actualmente se desconoce la influencia de la realización de nidos sobre la afección de los carpóforos por *L. cinnamomeus*. Estudios preliminares sugieren que los carpóforos recolectados en nidos presentan menos daños que los obtenidos en tierra, pero no existen trabajos publicados al respecto.

OBJETIVOS

A lo largo del desarrollo del presente capítulo se trabajará en la consecución de los siguientes objetivos:

- La profundización en el conocimiento de la biología de *Leiodes cinnamomeus* a través de:
 - El estudio de la influencia de la temperatura y humedad sobre el vuelo de *L. cinnamomeus*.
 - La determinación de la evolución de la sex-ratio de machos y hembras a lo largo de la campaña de producción de trufas.
 - La determinación de las horas de vuelo de *L. cinnamomeus*.
 - El trampeo en plantaciones con trufa de verano.
- El conocimiento de la influencia de la realización de aportes en plantaciones truferas (nidos) sobre el nivel de afección de los carpóforos por *L. cinnamomeus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los ensayos desarrollados a lo largo del presente capítulo fueron llevados a cabo en la provincia de Teruel, concretamente en la comarca Gúdar-Javalambre, por tratarse de una zona con elevada densidad de plantaciones en producción, y por tanto, con una alta afección por *L. cinnamomeus*.

Los trabajos se dividen en dos estudios. Por un lado, la profundización en el conocimiento de la biología de *L. cinnamomeus* llevada a cabo con trampeo con atrayentes alimenticios en parcelas con temperatura y humedad monitorizadas. Y por otro lado el estudio de la afección de trufas en carpóforos obtenidos dentro y fuera de nidos.

1- Biología y ecología de *Leiodes cinnamomeus*

1.1- Parcelas de estudio

El trabajo se llevó a cabo en tres parcelas productoras de trufa negra en los municipios de San Agustín, Manzanera y Albentosa (Fig. 4.9). Los ensayos de capturas de insectos se llevaron a cabo en dos campañas consecutivas, la temporada 2016-2017 y la temporada 2017-2018, con la intención de evitar sesgos en los resultados debidos a cambios en la meteorología.

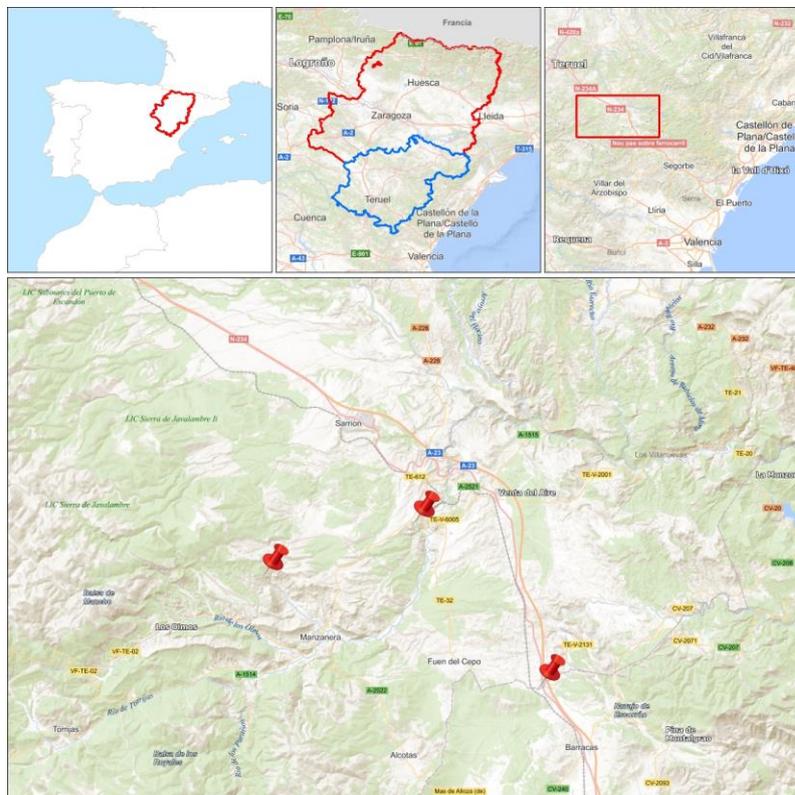


Figura 4.9. Mapa de ubicación de las plantaciones muestreadas.

En los trabajos de campo realizados en truficultura, la selección de parcelas es complicada debido a la heterogeneidad en las características edafológicas, climáticas y culturales de las plantaciones. Por ello, en la selección se priorizó en todo momento la elevada producción y la presencia de riego para asegurar la producción en las campañas en las que se realizó el estudio. Todas estas plantaciones presentan una elevada, constante y homogénea producción de trufa negra (*T. melanosporum*), contado con sistemas de riego, y realizando en todas ellas trabajos culturales similares. En dos parcelas se realizan trabajos de laboreo (parcelas 1 y 2). Todas presentan una edad similar (entre 20 y 25 años), tienen una elevada pedregosidad y una pendiente entre el 5 y 10%, excepto en la segunda parcela, que es entre el 0 y 5%. La especie forestal plantada en todos los casos es la encina (*Quercus ilex* L.), plantada a marco real de 6x6 metros. La recolección de carpóforos en las parcelas se realiza una vez por semana.

La parcela número 2 del estudio se seleccionó, no solamente por su elevada producción de carpóforos de trufa negra, sino también por llevarse a cabo en ella recolección de *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng. El objetivo principal era comprobar la capacidad de desarrollo de *L. cinnamomeus* en esta especie, y por lo tanto, su posible evolución en los meses estivales.

1.2.- Captura de los adultos

Los adultos fueron capturados con trampas de polipropileno blancas de 600mL de capacidad (Kartell, Fisher Scientific SL, Madrid, España) con tapa de rosca (Ruiz-Babarin *et al.*, 2010). En estos botes se realizaron orificios de 10mm para permitir la entrada de los insectos en la trampa (Fig. 4.10).



Figura 4.10.-Trampas con las que se realizaron las capturas de *Leiodes cinnamomeus*.

Dentro del bote se introdujo un vial de polietileno de baja densidad (Fisher Scientific SL, Madrid, España) con unas dimensiones de 5,8 cm de altura y 1,7 cm de diámetro, que se rellenó con 10mL de dimetil sulfuro (DMS) (Merck, Damstadt, Alemania).

Las trampas fueron enterradas hasta el nivel de la tapa, con los orificios enterrados 1-2 cm por debajo de la superficie del suelo para favorecer la entrada de los insectos.

1.3.- Diseño experimental

Se realizaron cuatro ensayos diferentes en las parcelas seleccionadas.

1.- El estudio de la relación de temperatura y humedad con las capturas de *L. cinnamomeus*

2.- La determinación de las horas de vuelo de *L. cinnamomeus*

3.- El estudio del sex-ratio de *L. cinnamomeus* a lo largo de la campaña

4.- La comprobación de la presencia de *L. cinnamomeus* en trufa de verano

1.3.1.- Trampeo

Los trabajos de campo (Fig. 4.11) se llevaron a cabo con la ayuda de técnicos del Servicio Provincial de Teruel del Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad. Fueron muestreadas un total de tres parcelas semanalmente a lo largo de dos campañas. Se colocaron las trampas con atrayentes en cada una de las plantaciones, en zonas en las que la producción era elevada y constante en el tiempo. Estas trampas fueron colocadas cada 24 metros, dentro del quemado, y en la medida de lo posible cerca del acceso a la plantación para evitar compactar la tierra al pisar en caso de existir excesiva humedad en el terreno. Las trampas fueron vaciadas y contabilizadas semanalmente a lo largo de la campaña trufera.



Figura 4.11.- Muestreo de las trampas colocadas en una de las plantaciones colaboradoras.

El primer año de muestreo (campaña 2016-2017) la colocación de las trampas se realizó en dos fases, debido a problemas con la adquisición del material. La primera fase fueron cuatro trampas, dos en la parcela 1 y dos en la parcela 3. La colocación de las mismas fue el 13

de septiembre, por lo que el primer muestreo se realizó el 20 de septiembre, y finalizó el 10 de mayo. El resto de trampas (6 más en la parcela 1, y 6 en la parcela 2) se colocaron el día 9 de noviembre, por lo que el primer muestreo fue el 16 de noviembre.

El segundo año de muestreo las trampas se colocaron el 3 de septiembre, por lo que el muestreo se inició una semana después, el 10 de septiembre, y finalizó el 29 de mayo. La fecha de finalización de campaña se estableció cuando en todas las parcelas hacía al menos tres semanas que no se obtenían capturas de *L. cinnamomeus*. Se muestreó un total de 32 semanas en la primera campaña, y 33 en la segunda.

En la primera campaña de muestreo se colocaron un total de 16 trampas, ocho en la parcela 1, seis en la parcela 2, y dos en la parcela 3. En la segunda campaña de muestreo, la temporada 2017-2018 se aumentó el número de trampas, colocando en total 24, 12 en la parcela 1 (debido a que en esta parcela se observó un menor número de capturas de *L. cinnamomeus* el año anterior), y seis trampas en cada una de las parcelas 2 y 3.

Es necesario asegurarse la colocación de las trampas con anterioridad a la emergencia del primer adulto. Por ello durante tres campañas se realizó un seguimiento con diferentes truficultores con la intención de detectar el primer vuelo de la campaña. Tras observar los resultados se estableció como semana de inicio de los trabajos (semana 0) la primera semana de septiembre, ya que se corresponde a un momento en el que se aseguraba que previamente no se iba a perder ningún dato de vuelo de *L. cinnamomeus*, habiéndose detectado la captura más próxima con tres semanas de posterioridad en todos los años.

El pisado de una plantación con un exceso de humedad en el terreno puede provocar la compactación del mismo. Por este motivo durante la campaña 2016-2017 debido a las intensas nevadas caídas en la zona de estudio no se pudo acceder a las plantaciones durante siete semanas. En estos casos, los insectos se acumularon en las trampas durante el periodo en el que no se pudo muestrear, siendo imposible conocer la fecha en la que se capturaron. Con la intención de no cometer errores en la estadística, asignando capturas a fechas a las que posiblemente no corresponden, se decidió no promediar los insectos presentes en las trampas entre las semanas anteriores, sino descartar y no contabilizar estas capturas.

Paralelamente se obtuvieron datos de temperatura y humedad cada hora en las parcelas muestreadas (Fig. 4.12).



Figura 4.12.- Sondas de temperatura y humedad empleadas para la captura de datos ambientales.

En las dos campañas de estudio se colocaron sensores de temperatura en el exterior y enterrados a 5 cm. Se seleccionó esta profundidad por tratarse de la zona con más variaciones de temperatura y humedad, y por tanto, considerarse la zona que podría tener una mayor influencia para la movilidad de *L. cinnamomeus*. Sin embargo, se colocaron otros sensores a diferentes profundidades (sondas de temperatura enterradas a 15-20 y 30 cm y de humedad a 15 y 30 cm) para comprobar la relación entre capturas y condiciones del medio en estas profundidades (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.- Disposición de los sensores de humedad y temperatura en las parcelas de estudio durante las dos campañas de estudio. T5sub: sensor de temperatura enterrado a 5cm; T15-20sub: sensor de temperatura enterrado entre 15 y 20 cm; T30sub: sensor de temperatura enterrado a 30cm; H15sub: sensor de humedad enterrado a 15cm; H30sub: sensor de humedad enterrado a 30cm; Text: sensor de temperatura a temperatura ambiente.

Año	Parcela	T5sub	T15-20sub	T30sub	H15sub	H30sub	Text
Año 1	P1						
	P2						
	P3						
Año 2	P1						
	P2						
	P3						

Para la toma de datos de suelo se emplearon sensores de temperatura y humedad de Decagon Devices, modelo 5TM. Los datos obtenidos fueron descargados con el software DataTrac 3 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

Se colocó un sensor a cada profundidad. Estos sensores son capaces de medir el contenido volumétrico de agua en el suelo (VWC) con una precisión de $\pm 2\%$ VWC, y la

temperatura con un intervalo de -40°C a +50°C, con una resolución de 0,1°C y una precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$.

Los datos fueron almacenados en el datalogger EM50, recogiendo datos continuos cada hora, y descargados con el programa DataTrac.

Los datos de temperatura ambiental se tomaron cada hora con el sensor HOBO Pro RH/Temp, capaz de operar en rangos de temperatura de -30°C a +50°C.

Cada sensor de temperatura exterior ubicado en las tres parcelas se introdujo dentro de una estación para evitar el impacto directo de la lluvia (o riego), las salpicaduras, la niebla, el polvo y los productos químicos en el aire, como la sal y el amoníaco, tal y como se indica en las instrucciones, y se colocaron a una altura de 40 cm.

1.3.2.- *Determinación del vuelo*

Además de la recogida de datos semanal, durante tres días de la campaña de recolección 2016-2017 se realizó un muestreo intensivo en el cual se vaciaron las trampas colocadas en todas las parcelas cada 8 horas durante 24 horas, a las 12:00h, 18:00h, 00:00h y 06:00h, con la intención de observar las franjas de vuelo más frecuentes de esta especie.

Cada trampa correspondiente a los muestreos realizados en el ensayo del estudio de la relación de temperatura y humedad con las capturas de *L. cinnamomeus* fue convenientemente señalizada previamente con la intención de poder localizarla en campo con facilidad en los muestreos nocturnos. Los insectos capturados en las trampas fueron introducidos en placas de Petri rotuladas para su posterior conteo e identificación en laboratorio.

Este ensayo tuvo tres repeticiones en tres fechas diferentes:

- Desde las 12:00 del día 16 de noviembre hasta las 12:00 del día 17 de Noviembre de 2016
- Desde las 12:00 del día 1 de diciembre hasta las 12:00 del día 2 de diciembre de 2016
- Desde las 12:00 del día 14 de diciembre hasta las 12:00 del día 15 de diciembre de 2016

1.3.3.- *Sex-ratio de Leiodes cinnamomeus*

En estudios de capturas preliminares se observó una diferente relación entre machos y hembras a lo largo de la campaña. Por este motivo, en todas las trampas correspondientes a los muestreos realizados en el ensayo del estudio de la relación de temperatura y humedad con las capturas de *L. cinnamomeus* no solo se contabilizaron los adultos capturados, sino también se sexó cada uno de los individuos para la obtención del sex-ratio.

La determinación del sexo se realizó siguiendo las descripciones de Arzone (1970), observando las diferencias morfológicas en las patas traseras de los adultos.

1.3.4.- Trampeo de plantaciones con trufa de verano

Las trampas colocadas en la plantación descrita como N°2 en el apartado 1.1.- *Parcelas de estudio*, en la que existe producción de *T. aestivum*, se mantuvieron durante todo el año durante dos campañas con la intención de comprobar la presencia o ausencia de adultos de *L. cinnamomeus* en aquellos meses en los que no existe recolección de trufa negra. Debido a la elevada volatilidad del atrayente, semanalmente se revisaban las trampas y los viales, y éstos eran sustituidos en caso de observarse deterioro en la emisión.

1.4.- Análisis estadístico

La base de datos original fue construida en Excel, para ser posteriormente analizada con el paquete estadístico R (R 3.6.3 GUI 1.70) (R Foundation for Statistical Computing, 2016) aplicando Modelos Aditivos Generalizados (GAMs).

La modelización con GAM, es una de las metodologías más empleadas actualmente en los trabajos sobre ecología (Wood, 2017). Se analizaron cada uno de los modelos propuestos por Pedersen *et al.* (2019) (Tabla 4.3), seleccionando de acuerdo al Akaike Information Criterion (AIC) aquel que presentó menor AIC.

Tabla 4.3.- Características de los diferentes modelos GAM (Pedersen et al., 2019) analizados.

	Un único suavizado (smoother)	Suavizado (<i>Smoother</i>) global	Misma vibración (<i>Wigginess</i>)
Modelo G	Si	Si	Si
Modelo GS	No	Si	Si
Modelo GI	No	Si	No
Modelos S	No	No	Si
Modelo I	No	No	No

La finalidad es realizar un modelo capaz de explicar las capturas en función de:

- La campaña (2016-2017 y 2017-2018)
- La semana (de la 3, que es cuando se comienzan a obtener datos de capturas, a la 34)
- La parcela (1,2 y 3)
- La campaña por parcela
- La variable ambiental (Temperatura y humedad)

Para el análisis estadístico de los datos del estudio de la relación de temperatura y humedad con las capturas de *L. cinnamomeus* se realizaron para cada uno de los sensores empleados en los trabajos:

- Medias para 7 días
- Medias de los mínimos para 7 días

- Medias de los máximos para 7 días

Estos datos fueron contrastados con los de capturas semanales para establecer las relaciones entre los parámetros climáticos y el vuelo de *L. cinnamomeus*.

El número de individuos capturados por semana y trampa se emplearon como variable dependiente para construir los modelos. Las medias, medias de los máximos y medias de las mínimas de la temperatura y humedad a diferentes profundidades fueron incluidas en los modelos como variables explicativas, así como el número de parcela.

Para el análisis estadístico de los datos del estudio del sex ratio de *L. cinnamomeus* a lo largo de la campaña se emplearon los datos de capturas semanales y el número de machos contabilizados en las trampas.

La proporción de machos fue incluida en los modelos como variable explicativa para construir los modelos, así como el número de parcela. La selección del modelo se realizó de acuerdo al Akaike Information Criterion (AIC), escogiendo aquel que presentaba menor AIC.

2.- Influencia de los nidos sobre los daños observados por *Leiodes cinnamomeus*

2.1.- Diseño experimental

2.1.1.- Parcela de estudio

La parcela de estudio comprende una superficie de más de 30 ha zonificada en función de diferentes sectores de riego. Tres de estas subparcelas fueron muestreadas semanalmente. Las características de las mismas son idénticas en cuanto a labores culturales, pero diferentes en cuanto a textura, presentando gradientes decrecientes de arena, de la parcela 1 a la 3, y gradientes crecientes en arcilla (Tabla 4.4).

Tabla 4.4.- Textura de las tres parcelas de estudio. Método sedimentación, Unidades % p/p.

Textura	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3
Arena total (0,05-2mm)	54,07	46,40	31,66
Limo grueso (0,02-0,05mm)	9,86	13,47	16,96
Limo fino (0,002-0,02mm)	17,51	21,06	27,51
Arcilla (>0,002mm)	18,56	19,07	23,87

El entorno que rodeaba a la plantación es el característico de un bosque esclerófilo dominado por la encina. El clima en el que se encuentran las parcelas es Mediterráneo con tendencia continental, con precipitaciones medias de 519mm y temperatura media de 11,1°C.

La finca se plantó en 2001 con encina (*Q. ilex*) y quejigo (*Quercus faginea* Lam.) inoculados con *T. melanosporum*. Fueron plantadas a un marco de plantación real de 6x6m. Las dos especies fueron plantadas en una proporción de 2:1 (encina-quejigo) en toda la parcela.

Cada año se realizan aproximadamente 10 nidos alrededor de cada árbol. Para ello se realizan orificios de 25cm de profundidad, que se rellenan con aproximadamente 1,5L de sustrato compuesto por turba rubia, turba negra, fibra de coco y perlita, y su pH está corregido a 7,5.

A este sustrato previamente se le añade trufa, a razón de 0,5 g de trufa fresca por litro de sustrato, y la mezcla se homogeneiza antes de incorporarse al suelo. Una vez introducido el sustrato, el nido se tapa con parte de la tierra retirada al hacer el orificio.

Los nidos se realizan en circunferencias concéntricas con el árbol. Cada año se realiza una circunferencia, alejándose del tronco aproximadamente 30-40 cm respecto a los nidos llevados a cabo con anterioridad.

La parcela dispone de un sistema de riego por microaspersión. Desde abril a octubre se realizan aportes hídricos durante periodos de escasez de precipitaciones, siguiendo el criterio de Le Tacon *et al.* (1982). Las trufas son recolectadas desde octubre hasta final de campaña (normalmente marzo) una vez por semana.

2.1.2.- Metodología de toma de datos

Durante las dos campañas de estudio, las tres parcelas se visitaron en repetidas ocasiones (Tabla 4.5). Se plantearon muestreos cada dos semanas en los cuales se recolectaron con el truficultor todas las trufas de los marques que el perro realizó hasta que se conseguían recolectar 10 trufas sanas procedentes de marques simples procedentes de nido y otras 10 de tierra en cada parcela. Cada una de las trufas fue observada, analizando el número de galerías presente en cada una, y observando si la procedencia de las trufas era de tierra o sustrato (nido o no nido).

Se comprende como *marque* a cada uno de los puntos del terreno donde el perro trufero ha detectado la presencia de carpóforos. Estos marques pueden ser simples, cuando se recolecta solamente un cuerpo fructífero, o pueden ser múltiples si se extrae más de una trufa.

Finalmente los muestreos se adaptaron a las condiciones climáticas y a la situación de humedad de la parcela, reduciendo el número a 7 muestreos por parcela y año.

Tabla 4.5.- Fechas de muestreo de las tres parcelas de estudio durante las dos campañas.

Campaña 2016-2017	Campaña 2017-2018
18/11/2016	2/11/2017
12/12/2016	16/11/2017
10/1/2017	5/12/2017
7/2/2017	20/12/2017
20/2/2017	10/1/2018
7/3/2017	31/1/2018
22/3/2017	7/3/2018

En cada uno de los muestreos los carpóforos fueron recolectados con la ayuda de un perro entrenado para este fin. Las semanas en las que no se muestreó, el propietario realizó la búsqueda habitual (una vez por semana), excepto las semanas en las que un exceso de humedad o una precipitación en forma de nieve lo impidieron.

Las trufas fueron clasificadas como obtenidas de nido cuando la turba se encontraba con su estructura física característica (sin signos claros de degradación) y el nido permanecía intacto (sin signos de haber sido desmontado o mezclado con el suelo). En la gran mayoría de los casos, esto ocurrió en nidos de 2 a 4 años (estimados a través de la distancia al tronco y la apariencia general de la turba).

Cada una de las trufas fue cepillada *in situ* para eliminar las partículas de tierra adheridas y permitir de este modo la observación y conteo de las galerías y otros signos de degradación.

2.2.- Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa informático R (R 3.6.3 GUI 1.70) (R Foundation for Statistical Computing, 2016) aplicando Modelos Aditivos Generalizados (GAMs) para analizar el efecto de los nidos sobre la incidencia de *L. cinnamomeus*.

Se empleó una distribución del error binomial para conocer la proporción de cuerpos fructíferos infestados por *L. cinnamomeus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Biología y ecología de *Leiodes cinnamomeus*

1.1- Relación de temperatura y humedad vs capturas de *L. cinnamomeus*

Tal y como se puede observar en la tabla 4.6, en la que se muestra un resumen de los datos de capturas obtenidos a lo largo de las dos campañas de estudio, durante el primer año de muestreo, correspondiente a la campaña trufera 2016-2017 se capturaron durante las 32 semanas de muestreo un total de 1139 adultos en las 16 trampas colocadas. La primera captura se realizó el 3 de octubre, y la última captura fue el 29 de marzo en las parcelas 1 y 2 y el 5 de mayo en la parcela 3.

Hubo en total durante el primer año 26 semanas con capturas en la parcela 1 y 29 en la parcela 3. En la parcela 2 hubo 20 semanas, aunque en este caso las trampas se colocaron con posterioridad a la fecha de inicio de vuelo, tal y como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos.

Los máximos de capturas para este primer año de muestreo fueron:

- Parcela 1= 20 adultos en una sola trampa el 28 de diciembre
- Parcela 2= 37 adultos en una sola trampa el 28 de diciembre
- Parcela 3= 15 adultos en una sola trampa el 8 de marzo

Desglosando los datos por parcelas, durante el primer año se capturaron 367 adultos en la parcela 1, 605 adultos en la parcela 2 y 167 adultos en la parcela 3. Descontando las semanas en las que no hubo capturas en ninguna de las trampas, se muestrearon 128 trampas en la primera parcela, 78 en la segunda y 50 en la tercera, por lo que los ratios de capturas por trampa serían de 2,87 adultos de *L. cinnamomeus* por trampa en la parcela 1, 7,75 en la parcela 2, y 3,34 en la parcela 3.

A lo largo del segundo año de muestreo, la población de *L. cinnamomeus* fue muy superior respecto al año anterior. Se capturaron durante las 33 semanas de muestreo un total de 8340 adultos en las 24 trampas colocadas. El primer vuelo de adulto se detectó el 27 de septiembre en las tres parcelas, y la última captura fue el 21 de marzo en la parcela 1, y el 28 de marzo en las parcelas 2 y 3. Se capturaron adultos durante 26 semanas en la parcela 1, y 27 en las parcelas 2 y 3.

Los máximos de capturas para el segundo año de muestreo fueron:

- Parcela 1= 48 adultos en una sola trampa el 31 de octubre
- Parcela 2= 188 adultos en una sola trampa el 22 de noviembre
- Parcela 3= 132 adultos en una sola trampa el 29 de noviembre

Durante el segundo año de muestreo se capturaron 1294 adultos en la parcela 1, 4525 adultos en la parcela 2 y 2521 adultos en la parcela 3. Descontando las semanas en las que no hubo capturas en ninguna de las trampas, se muestrearon 312 trampas en la primera parcela, 162 en la segunda y 162 en la tercera, por lo que los ratios de capturas por trampa serían de 4,15 adultos de *L. cinnamomeus* por trampa en la primera parcela, 27,93 en la segunda, y 15,56 en la tercera.

Tabla 4.6.- Resumen de los datos de capturas obtenidos a lo largo de las dos campañas de estudio, 2016-2017 y 2017-2018.

Campaña	Parámetro	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Datos generales
Campaña 2016-2017	Total capturas	367	605	167	32 semanas de muestreo 1139 adultos capturados 16 trampas
	Máxima captura por trampa	20	37	75	
	Primera captura	3/10/2016	3/10/2016	3/10/2016	
	Última captura	29/3/2017	29/3/2017	5/5/2017	
	Adultos por trampa	2,87	7,75	3,34	
Campaña 2017-2018	Total capturas	1294	4525	2521	33 semanas de muestreo 8340 adultos capturados 24 trampas
	Máxima captura por trampa	48	188	132	
	Primera captura	27/9/2017	27/9/2017	27/9/2017	
	Última captura	21/3/2018	28/3/2018	28/3/2018	
	Adultos por trampa	4,15	27,93	15,56	

Para llevar a cabo el trabajo estadístico se comenzó analizando la segunda campaña por ser aquella que presenta más cantidad de datos, para posteriormente añadir el primer año de muestreo y comprobar si el modelo generado coincide con el del primer año.

Comenzando con la **segunda campaña** (2017-2018), se seleccionó el modelo GI por tener el menor criterio de información de Akaike (AIC). De acuerdo a este criterio de información, la temperatura media del aire y la humedad media a 15cm resultaron ser las variables que aportaron una mayor explicación al modelo.

Se puede observar (Fig. 4.13) que las capturas aumentan con la humedad del suelo (p -valor $<0,001$; $n=678$). Esto confirma los trabajos llevados a cabo por Pérez-Andueza (2015b), en los que afirma que la humedad puede favorecer el movimiento de los insectos en el suelo. Esto puede ser debido a la compactación de los suelos con tendencia arcillosa en condiciones de déficit hídrico, y a la capa superficial que se produce en los suelos (principalmente con tendencia arenosa y limo-arenosa) en ausencia de humedad, lo que dificultaría la emergencia de los adultos.

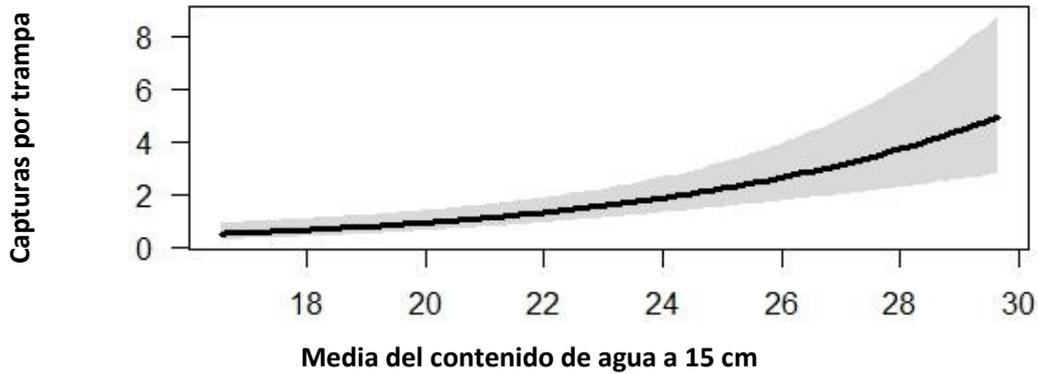


Figura 4.13.- Representación gráfica del modelo en el que se muestran las capturas por trampa en la campaña 2017-2018 en función de la humedad del suelo a 15 cm de profundidad. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza ($n=678$; $\alpha=0,05$).

En relación a la temperatura media exterior, se observa que a bajas temperaturas medias (aproximadamente $2,5^{\circ}\text{C}$) las capturas son escasas (p -valor $<0,001$; $n=678$), (Figura 4.14). Con temperaturas elevadas las capturas son significativamente mayores aunque existe más variabilidad, debido a que a final de campaña en muchas de las trampas ya no había capturas de adultos, y cuando había capturas, la cifra era baja.

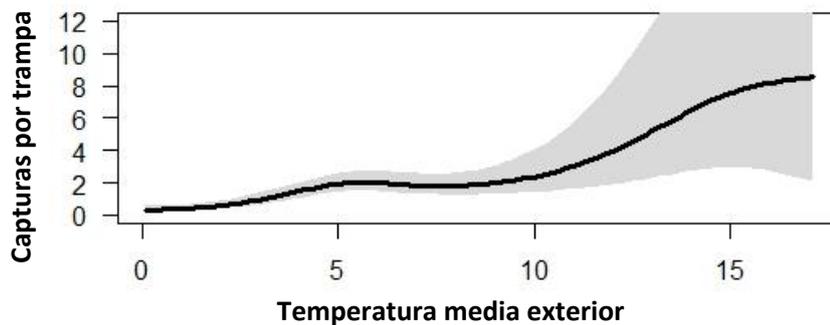


Figura 4.14.- Representación gráfica del modelo de en la que se muestran las capturas por trampa en función de la temperatura media exterior en la campaña 2017-2018. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza ($n=678$; $\alpha=0,05$).

En cuanto a capturas por semana en cada parcela, se observa que cada bloque se comporta de forma diferente en cuanto a cantidad de insectos capturados, aunque coinciden en los picos de población (Figura 4.15). Existe un primer pico de adultos capturados en torno a la semana 12-13 que es más notable en la parcela 2 (posiblemente debido a una mayor producción de carpóforos o a una mayor cantidad de los mismos sin recolectar la temporada anterior), y un segundo pico menos marcado, principalmente presente en la parcela 2, en torno a la semana 23.

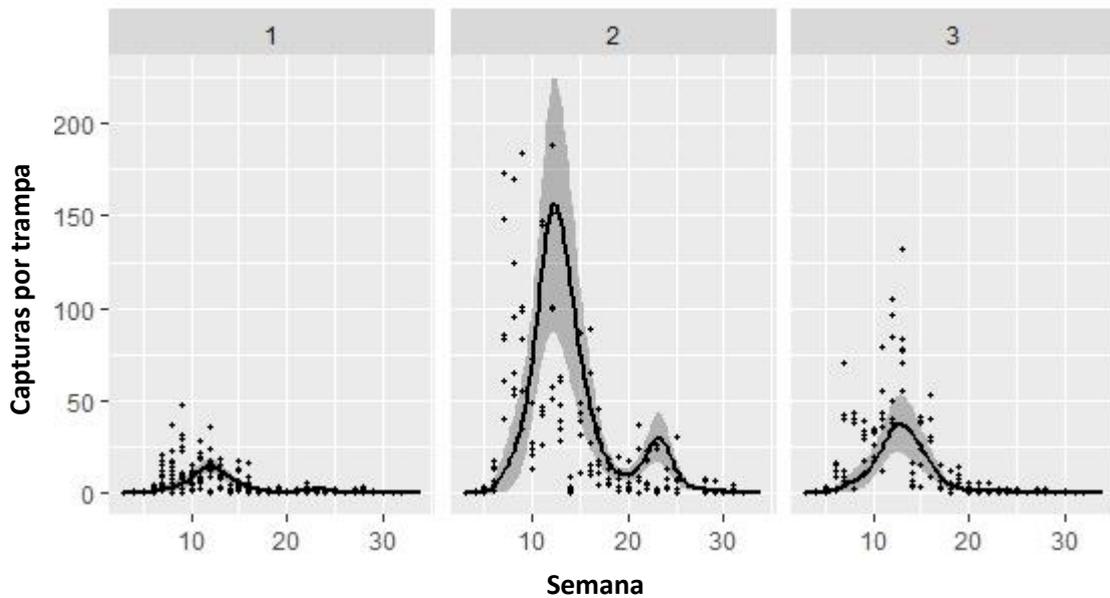


Figura 4.155.- Modelo gráfico del diseño en el que se representan las capturas por trampa y semana para cada una de las parcelas de estudio. 1: parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=678; $\alpha=0,05$).

Añadiendo al modelo la variable “campaña”, **incluyendo el primer año de muestreo**, el modelo que mejor se ajusta es el I, presentando éste el menor criterio de información de Akaike (AIC).

La temperatura media del aire (Fig. 4.16) es significativa, y explica el 73% del modelo. Temperaturas excesivamente bajas pueden provocar la congelación de la capa superficial del terreno, dificultando la emergencia de los adultos al exterior. Pérez-Andueza (2015a) afirmó que las temperaturas bajo cero, bien en forma de heladas o bien en forma de nevadas, impiden que los adultos salgan del suelo y realicen sus vuelos en busca de nuevos hospedadores, de forma que los adultos permanecen bajo tierra.

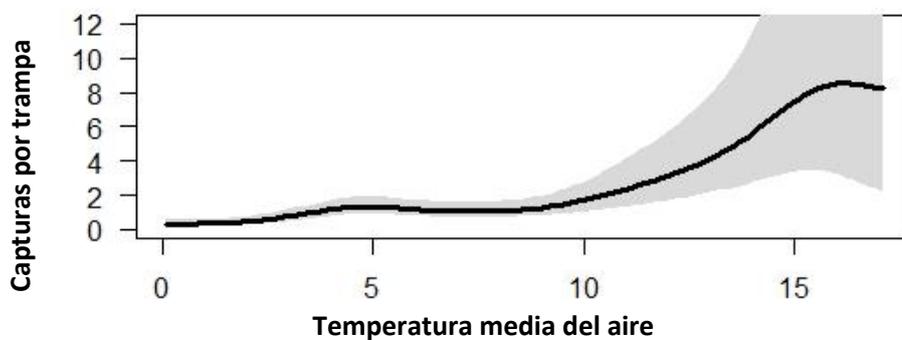


Figura 4.166.- Capturas por trampa en función de la temperatura media del aire para las dos campañas estudiadas. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza (n=926 $\alpha=0,05$).

La variabilidad en el número de capturas observada puede ser justificada debido a la diferencia de capturas de trampa a trampa. Dentro de una plantación la distribución de trufas no es homogénea, ya que no todos los árboles son productores, y la cantidad de trufas producidas por árbol no es la misma, del mismo modo que tampoco lo es la distribución del micelio y de las micorrizas presentes (Queralt *et al*, 2017). Posiblemente por este motivo, las trampas no capturan la misma cantidad de adultos, y por tanto las larvas áfagas tampoco se encuentran repartidas de igual forma, y por tanto los adultos que emergen del capullo terroso posiblemente se aglutinen en en las zonas con mayor producción de trufa negra.

Los resultados de este modelo indican que las tres parcelas tienen diferencias en cuanto a cómo varían en el tiempo las capturas (Figura 4.17). Cada parcela cambia de cantidad de adultos capturados en cada campaña, lo que podría ser justificado con la diferencia en la cantidad de carpóforos (y por tanto, la disponibilidad trófica) producida cada año dentro de la misma finca, hecho observado en otros coleópteros como *Oxyops vitiosa* Pascoe (Prat *et al.*, 2010).

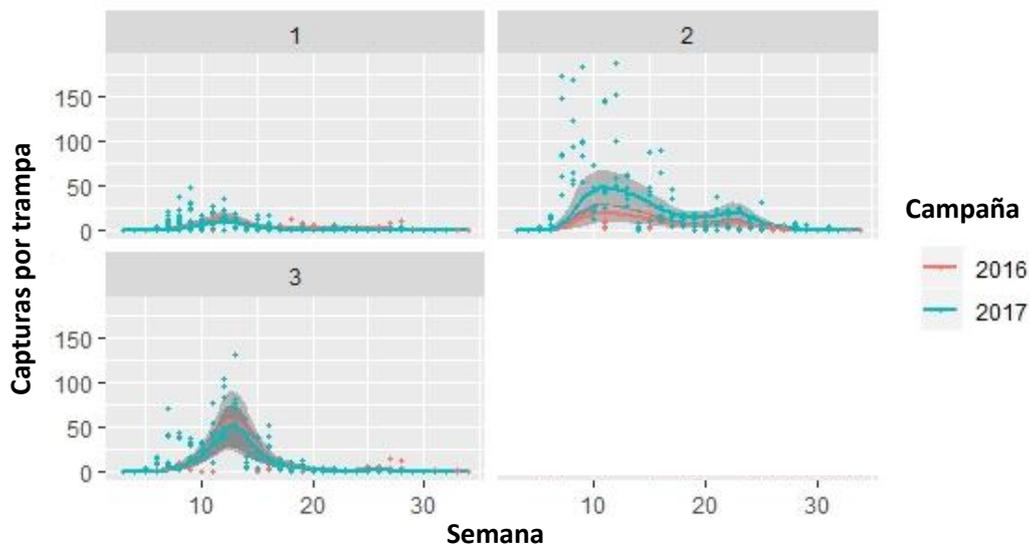


Figura 4.177.- Representación gráfica del modelo: capturas por trampa y semana en cada una de las parcelas durante las dos campañas de estudio. Los números 1, 2 y 3 hacen relación a cada una de las parcelas de estudio. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error que indican el 95% de intervalo de confianza ($n= 926$; $\alpha=0,05$).

Para las dos campañas, tal y como se apreciaba en los análisis de la campaña 2017-2018, todas las parcelas manifiestan un pico de capturas de *L. cinnamomeus* entre la semana 10 y la 13 (primera semana de noviembre para la parcela 2 y última de noviembre para las parcelas 1 y 3). La parcela 2 presenta un segundo pico de capturas de *L. cinnamomeus* sobre la semana 22 y 23, que también lo manifiesta la parcela 3, aunque de forma más sutil. Posiblemente esta diferencia reside en una mayor producción de trufa, o una menor presión de recolección en la parcela 2.

Se puede concluir de los datos obtenidos que no existe una misma curva para todas las parcelas. Cada una de ellas presenta un patrón temporal de capturas diferente, aunque las tres coinciden en un pico de población en noviembre.

La relación campaña por parcela es significativa, lo que implica que cada parcela puede cambiar de un año a otro, aunque no todas cambian del mismo modo entre las campañas. Esto puede ser debido a la diferencia en la disponibilidad trófica que presenta cada parcela cada año. La producción de carpóforos no es igual todos los años, por lo que las campañas con una mayor producción de carpóforos presentarán una mayor cantidad de *L. cinnamomeus*. Del mismo modo, no todas las parcelas producen por igual, por lo que la afección por *L. cinnamomeus*, los adultos capturados, también variarán anualmente.

En este trabajo se ha observado que la temperatura del aire influye en el número de adultos capturados de *L. cinnamomeus*, al igual que la humedad a 15 cm de profundidad. Por ello es preciso realizar una recolección exhaustiva a partir de los 12-15 días posteriores a la ocurrencia de temperaturas elevadas (es el tiempo que precisa la fase de huevo), así como de precipitaciones caídas o aportes de riego, con la intención de minimizar la presencia de carpóforos que sean un recurso trófico para las larvas de *L. cinnamomeus*.

Se debe de prestar atención a la fecha de colocación de las trampas para la captura masiva de *L. cinnamomeus*, ya que la curva de crecimiento de capturas que se ha observado indica un aumento muy importante de la población de adultos de *L. cinnamomeus* en pocos días. El máximo pico de capturas se ha encontrado en el mes de noviembre, lo que implica que considerando los días que transcurren desde el apareamiento a la aparición de las larvas micófagas, el periodo de máximo daño en los carpóforos coincide con la época de las fiestas de Navidad y fin de año, momento en que la trufa alcanza el valor más alto de la campaña.

La captura de adultos se ha iniciado en todas las campañas de estudio en el mes de septiembre, hecho relevante a la hora de colocar las trampas en las plantaciones. El trampeo debe iniciarse antes de que comience el vuelo de los adultos, por lo que se recomienda la instalación de este método de control a principios del mes de septiembre. Esto deriva en la necesidad de la creación de viales capaces de emitir sustancias atrayentes a lo largo de toda la campaña, y en todos los registros de temperatura, siendo necesario un emisor capaz de emitir constantemente desde septiembre hasta mayo.

1.2.- Franjas horarias de vuelo de *L. cinnamomeus*

Desde las 12:00h del 16 de noviembre a las 12:00h del 17 de noviembre de 2016 se capturaron un total de 12 adultos en 10 de las 30 trampas colocadas, 9 de ellos en la franja temporal entre las 12:00 y 18:00h.

Desde las 12:00h del 01 de diciembre a las 12:00h del 02 de diciembre de 2016 se capturaron un total de 17 adultos en 12 de las 30 trampas colocadas, 8 de ellos en la franja temporal entre las 12:00 y 18:00h.

Desde las 12:00h del 14 de diciembre a las 12:00h del 15 de diciembre de 2016 se capturaron un total de 16 adultos en 12 de las 30 trampas colocadas, 13 de ellos en la franja temporal entre las 12:00 y 18:00h. En la tabla 4.7 se muestra el total de capturas llevadas a cabo en el ensayo.

Tabla 4.7.- Total de capturas en el ensayo de horas de vuelo realizado en la campaña 2016-2017 en la que se vaciaron un total de 30 trampas durante 24 horas consecutivas tres periodos de tiempo diferentes. Las trampas que no tuvieron capturas no aparecen reflejadas en la tabla.

10,5	Franja horaria	Número de capturas	Trampa
16/11/2016	12:00-18:00	2	Hv2
		1	Hv6
		1	1M
		1	2M
		1	4M
		2	5M
	18:00-00:00	1	V1
		0	--
	00:00-06:00	0	--
		1	HV5
		1	V3
		1	V4
01/12/2016	12:00-18:00	2	Hv1
		1	Hv4
		1	Hv8
		1	3M
		1	6M
		1	3A
	18:00-00:00	1	6A
		2	1M
	00:00-06:00	2	2M
		1	3M
		2	2M
		2	6M
14/12/2016	12:00-18:00	0	--
		2	Hv1
		1	Hv3
		1	6M
		1	V1
		1	4 ^a
	18:00-00:00	1	T3
		2	T4
		2	T5
		2	T6
		1	Hv3
		1	M3
00:00-06:00	1	T3	
	0	--	

Se ha observado una mayor emergencia de adultos de *L. cinnamomeus* en la franja horaria correspondiente al atardecer (desde las 12:00h a las 18:00h), comportamiento habitual en coleópteros Escarabeidos (Wensler, 1974; Tocco *et al.*, 2019), Estafilínidos (Nisimura *et al.*, 2005) y Escolítidos (Chen y Seybold, 2014).

Se abre así la posibilidad del diseño de trampas que emitan aromas en las horas más frecuentes de vuelo, consiguiendo de este modo una mayor eficiencia en la emisión del compuesto, así como una mayor focalización de los puntos de captura, evitando la dispersión del compuesto en la superficie de la parcela.

Sin embargo, estos resultados son una mera observación, ya que el número de capturas no permite la realización de una estadística sólida. Por ello se considera necesaria la repetición del ensayo en años sucesivos, con un mayor número de trampas, y durante más días.

1.3.- Sex ratio en el desarrollo de la campaña

El trampeo mediante capturas masivas con atrayentes aromáticos se muestra una solución eficaz para disminuir las poblaciones de *L. cinnamomeus*. Este método de control tiene un impacto nulo sobre el medio ambiente y sobre la salud. Dicha técnica se basa en el empleo de un gran número de trampas con la intención de capturar el mayor número de adultos con la intención de reducir su presión sobre el cultivo. Para que estos métodos de control funcionen de una forma eficiente es importante que las capturas sean equitativas entre machos y hembras, ya que una presión sobre los machos no impide que las hembras continúen siendo fecundadas por los machos que queden, y por tanto, continuando con la reproducción de la especie. En este sentido, los resultados obtenidos muestran un ratio muy similar de capturas de machos y hembras, mostrando este método de captura masiva como una buena estrategia de control. Para el primer año de estudio se ha obtenido un porcentaje de machos del 55,66%, y para el segundo un 47,96%. Esto muestra un ratio de capturas muy equitativo entre los sexos, y demuestra que tanto machos como hembras se ven atraídos por el atrayente alimenticio empleado en los viales.

Como se puede observar en la tabla 4.8, donde se indica el número de adultos capturados por parcela y por campaña, a lo largo de las 32 semanas de muestreo de la primera campaña de estudio (2016-20217) se capturaron 1139 adultos, de los cuales 634 fueron machos, y 505 hembras. Durante las 33 semanas del segundo año de muestreo se capturaron un total de 8340 adultos, 4000 machos y 4340 hembras.

Analizando los datos por parcelas, durante el primer año se capturaron 367 adultos en la parcela 1 (229 machos y 138 hembras), 605 adultos en la parcela 2 (353 machos y 252 hembras) y 167 adultos en la parcela 3 (52 machos y 115 hembras).

Durante el segundo año de muestreo se capturaron 1294 adultos en la parcela 1 (666 machos y 628 hembras), 4525 adultos en la parcela 2 (2169 machos y 2356 hembras) y 2521 adultos en la parcela 3 (1165 machos y 1359 hembras).

Tabla 4.8.- Capturas de adultos y resultados del sexado de los mismos en cada una de las parcelas y en global para cada campaña de muestreo.

Campaña	Parámetro	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Datos generales
Campaña 2016-2017	Total capturas	367	605	167	1139
	Total machos	229	353	52	634
	Total hembras	138	252	115	505
Campaña 2017-2018	Total capturas	1294	4525	2521	8340
	Total machos	666	2169	1165	4000
	Total hembras	628	2356	1359	4340

La estrategia estadística a seguir en este análisis fue la misma empleada en el apartado 1.1- *Relación de temperatura y humedad con las capturas de Leiodes cinnamomomeus*. Se comenzó trabajando con los datos de la segunda campaña, por ser la campaña de la que disponía de más datos, y en función de los resultados obtenidos se añadió la primera campaña al estudio.

En el primer análisis, correspondiente al **segundo año de muestreo**, se trabajó con los datos de capturas, sexo y parcelas, y se añadieron las variables ambientales para comprobar si tuvieran influencia en el sexo de los adultos capturados. Las variables ambientales elegidas según el Akaike Information Criterion (AIC), son la Temperatura máxima del aire (Tmax) y la Humedad Relativa mínima a 15 cm de profundidad. Además se incluyen en el modelo la variable semana, y la variable semana+parcela. El modelo GAM elegido finalmente es el GI, presentando un menor AIC.

Tal y como se puede observar en la tabla ANOVA (Tabla 4.9) las variables ambientales no son significativas, pero sí que lo es variable semana (con un mayor nivel de significación) y la interacción parcela x semana. Para la variable semana, como podemos observar, $p < 0.05$ ($p = 3,12e-16$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de las variables. Teniendo en cuenta estos datos, el factor machos se ve afectado por la variable semana, por lo que en función de la semana de campaña se pueden capturar más o menos machos.

Tabla 4.9.- ANOVA de la relación de machos capturados en las trampas contabilizadas a lo largo de la segunda campaña de muestreo con las variables *Semana*, *Semana+parcela*, *Temperatura máxima del aire* y *Humedad relativa mínima a una profundidad de 15cm*. Los asteriscos indican niveles de significación (0:***; 0,001:**; 0,1:*). N=428.

	Chi. sq	p-value
Semana	79,727	3,12e-16***
Semana + parcela	3,957	0,0297*
Tmax aire	1,950	0,1654
HRmin 15	6,624	0,0933

Tal y como se observa en la figura 4.18, existe una distribución temporal de machos en las tres parcelas de estudio a lo largo de la segunda campaña muestreada. Al inicio de la campaña se observa una mayor proporción de machos capturados. Esta tendencia revierte a final de campaña, momento en el que la proporción de hembras capturadas es mayor que la de machos.

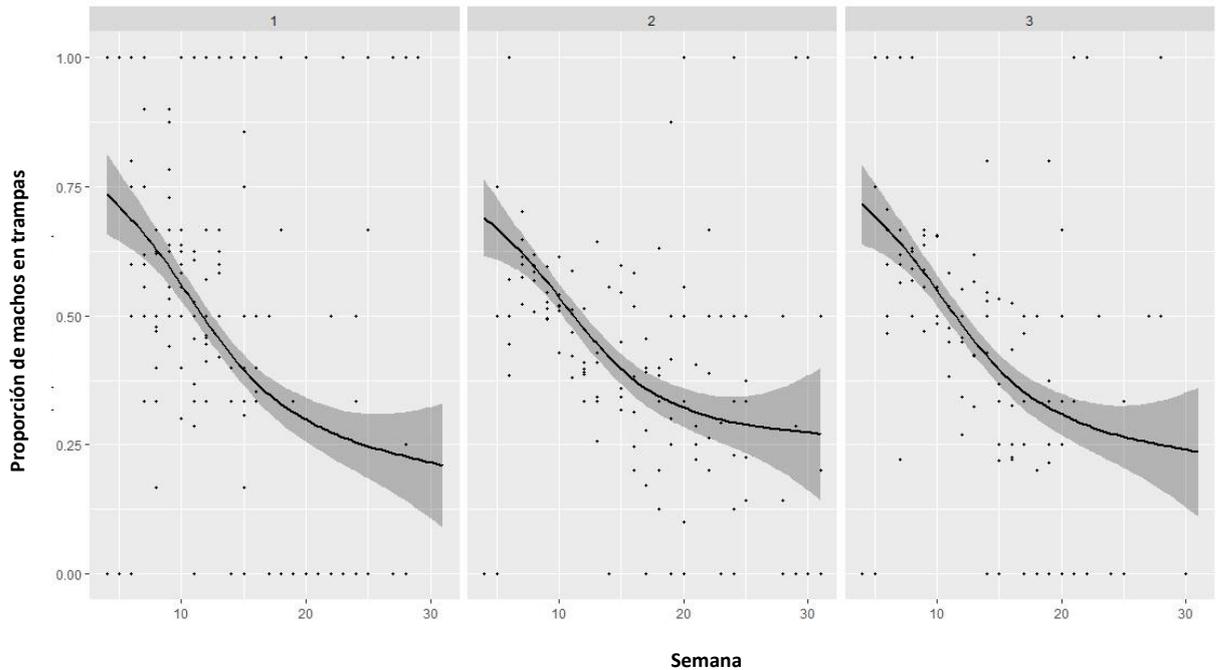


Figura 4.18.- Representación gráfica del modelo: machos capturados en función de las semanas y las parcelas en la campaña 2017-2018. 1: Parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error (zona sombreada) que indican el 95% de intervalo de confianza (n=428; $\alpha=0,05$).

El análisis estadístico de las **dos campañas** arroja resultados similares. En la tabla 4.10, correspondiente a la ANOVA de las variables semana, parcela, semana+parcela y parcela por campaña se observa una relación significativa entre la proporción de machos y la semana, lo que indica que en función de la semana, aparecerá una mayor o menor proporción de machos o de hembras. No se añadieron las variables ambientales al modelo por haberse comprobado en la primera campaña que no eran significativas.

Tabla 4.10.- ANOVA de la relación de machos capturados en las trampas contabilizadas a lo largo de la segunda campaña de muestreo con las variables *Semana*, *Parcela*, *Semana+parcela* y *Parcela+campaña*. Los asteriscos indican niveles de significación (0:***; 0,001:**; 0,1:*). N=665.

	Edf	Ref. df	Chi. sq	p-value
Semana	2.2643481	2.741	124.182	<2e-16***
Parcela	0.0041893	3.000	0.006	0.425737
Semana+Parcela 1	0.0007116	11.000	0.000	0.643131
Semana+Parcela 2	3.7009649	11.000	379.133	0.003768
Semana+Parcela 3	0.7920709	11.000	2.048	0.0463345
Parcela+campaña	5.7639282	6.000	194.642	<2e-16***

En la representación gráfica del modelo (Figura 4.19) puede observarse una tendencia en todas las parcelas y las dos campañas de prevalencia de machos a principio de campaña, y de prevalencia de hembras al final de la misma.

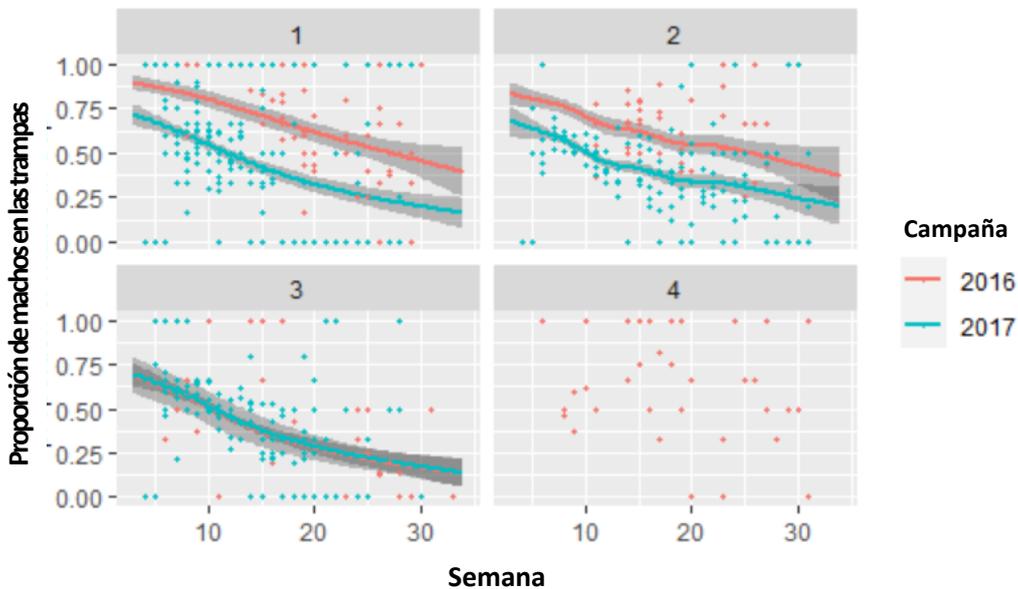


Figura 4.19.- Representación gráfica del modelo: machos capturados en función de las semanas y las parcelas en las dos campañas de estudio. 1: Parcela 1; 2: parcela 2; 3: parcela 3. Predicciones del modelo GAM, con bandas de error (zona sombreada) que indican el 95% de intervalo de confianza (n=665; $\alpha=0,05$).

Se observa una mayor dispersión de los datos a final de campaña hecho debido al inferior número de capturas por trampa durante las últimas semanas de muestreo, aumentando de este modo la dispersión de los datos.

Esta diferencia en la proporción de machos y hembras a lo largo de la campaña fue observada por Balachowsky (1962), quien afirmó que “*en diferentes familias de la superfamilia Scarabaeoidea, a la que pertenece la familia Leiodidae, al inicio del periodo de salidas del suelo (y durante el crepúsculo) aparecen principalmente machos. Las hembras, más lentas en*

reaccionar no aparecen en mayor proporción (más del 50% del total) hasta pasadas 1 o dos semanas, según sean las condiciones climáticas. Esta es una manera habitual del comportamiento de algunas especies de escarabajos".

Esta afirmación corroboraría los resultados observados a lo largo de dos años de campaña, en la que se ha observado una mayor emergencia de machos a principio de campaña, y una mayor proporción de hembras al finalizar la misma. Esto se debe a que los machos emergen unos días antes para fecundar a las hembras recién emergidas. Este hecho ha sido observado para una gran cantidad de especies, como los coleópteros cerambícidos *Arhopalus syriacus* (Reitter) (Fachinetti *et al.*, 2015), y *Arhopalus ferus* (Hutcheson, 1980) u otras especies como los dípteros (Lounibos y Escher, 2008).

1.4.- Trampeo de plantaciones con trufa de verano

No se han obtenido capturas de adultos de *L. cinnamomeus* en los meses comprendidos entre mayo y septiembre, ni siquiera en zonas productoras de trufa de verano. No se han capturado adultos en las trampas colocadas para tal fin, ni se han observado larvas de *L. cinnamomeus* en carpóforos de esta especie. Esto confirma la elevada especificidad del escarabajo de la trufa, que solamente es capaz de alimentarse en los meses en los que *T. melanosporum* está en fase de maduración. Este hecho ya había sido observado con anterioridad por otros autores (Arzone, 1971; Callot, 1999; Paccioni y Lalli, 1990; Oliver *et al.*, 1996; Reyna, 2012).

Esta elevada especificidad puede favorecer los sistemas de trampeo actuales con atrayentes alimenticios, ya que la colocación de las trampas se ceñirá al periodo de producción de trufa negra, evitando los meses de más calor, y por tanto los de más volatilidad del atrayente. Esto permitirá economizar en gastos de renovación de los viales y concentrar los esfuerzos de captura en los meses de septiembre a mayo.

2.- Influencia de los nidos sobre los daños observados por *Leiodes cinnamomeus*

A lo largo de las campañas 2016-2017 y 2017-2018, se recolectaron 1865 carpóforos de *T. melanosporum* en un total de 1212 marques (Tabla 4.11).

Tabla 4.11.- Número de carpóforos de *Tuber melanosporum* recolectados en cada una de las subparcelas durante las dos campañas de muestreo en función de su recolección en nidos o en tierra.

Campaña	Subparcela	Carpóforos	
		Tierra	Nidos
Campaña 2016- 2017	1	137	239
	2	163	143
	3	79	50
Campaña 2017- 2018	1	178	225
	2	166	146
	3	149	190

Se detectaron daños producidos por *L. cinnamomeus* en 431 trufas, lo que supone un 23,1% de carpóforos recolectados. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, en el que se observa que el mayor número daño provocado por *L. cinnamomeus* corresponde al periodo de máximo valor de la trufa, el hecho de tener este porcentaje de carpóforos dañados por *L. cinnamomeus* supone una pérdida económica muy relevante para los truficultores.

Además de los daños ocasionados por *L. cinnamomeus*, se observaron otros daños bióticos y abióticos con mucha menor incidencia:

- Pudrición en el 3,1% de carpóforos
- Daños por dípteros del género *Suillia* en el 2,9% de carpóforos
- Agrietamiento de superficie en el 1,6% de carpóforos
- Daños por congelación en el 0,5% de carpóforos

La proporción de cuerpos fructíferos dañados por *L. cinnamomeus* fue significativamente menor en nidos que en el suelo ($P_{Holm} = 0,044$) (Fig. 19; Tabla 4.12). En la tabla 12 se puede observar el modelo propuesto para la explicación de la proporción de carpóforos dañados por *L. cinnamomeus*.

Tabla 4.12.- Modelo GAM seleccionado por su menor AIC para la proporción de carpóforos dañados por *Leiodes cinnamomeus* (n=1865). Desviación explicada: 9,5%. P-valor ajustados con una corrección Holm-Bonferroni para comparaciones múltiples. Gl: grados de libertad.

	Chi-cuadrado	P-valor	gl
Campaña	4,334	0,370	1
Subparcela	1,545	1	2
Nido	8,124	0,044	1
Tiempo (día de la campaña)	12,664	0,0004	2,1

Puede observarse en la tabla 4.12 que la variable “Tiempo (día de campaña)” es significativa, lo que significa que los daños no son homogéneos a lo largo de la campaña, del mismo modo que se ha observado con anterioridad que los vuelos tampoco lo son.

La representación del modelo (Fig. 4.20) muestra que la incidencia de *L. cinnamomeus* dentro de nidos es significativamente menor que la de suelo (n=1865; $\alpha=0,05$).

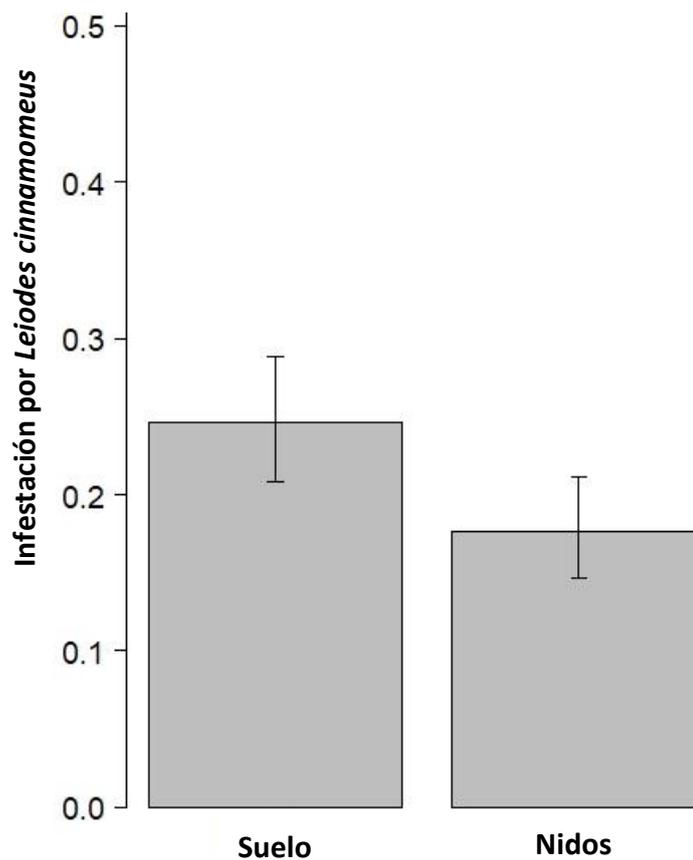


Figura 4.19.- Frecuencia de aparición de trufas dañadas por *Leiodes cinnamomeus* en función de su procedencia (tierra / nido). Las barras representan la desviación típica a un 95% de confianza. Los datos han sido agrupados para las tres subparcelas de estudio. Predicciones del modelo GAM con N=1865 y $\alpha=0,05$.

Es preciso tener en cuenta que los nidos favorecen la producción de trufa en las paredes de los mismos. De este modo, en numerosas ocasiones se han recolectado carpóforos (que en este estudio han sido considerados como “trufa de nido”) en los que la parte de trufa desarrollada en sustrato no presentaba galerías, pero sí lo hacía la parte que se desarrolló en la tierra (Fig. 4.21).

Esto puede tener relación directa con el ciclo biológico de *L. cinnamomeus*. Durante la época estival, las larvas (L3) vacían su contenido estomacal y permanecen hasta septiembre enterradas en un capullo terroso (Arzone, 1970). Para la realización de este capullo, se necesitan partículas de suelo finas, que en el interior de los nidos se encuentran en menor proporción. Por este motivo, las larvas de *L. cinnamomeus* pueden encontrar dentro de los nidos un terreno hostil para la finalización de su etapa larvaria.



Figura 4.201.- Carpóforo recolectado en la pared de un pozo, habiéndose desarrollado parte de su superficie en la turba, y la otra parte en la tierra.

La realización de nidos en plantaciones truferas puede, no solo contribuir a la obtención de trufas de mayor calidad en cuanto forma, también a la recolección de trufas más sanas, y por tanto de mayor valor en el mercado. Esta técnica puede emplearse en el control integrado de *L. cinnamomeus* en un contexto de agricultura ecológica, siempre y cuando la turba empleada cumpla con la legislación aplicable a agricultura ecológica.

Además, se recomienda una serie de buenas prácticas en la recolección de trufa negra, que incluyen la eliminación de la mayor parte de cuerpos fructíferos de las plantaciones truferas. Según Schneider-Maunoury y colaboradores (2019) en promedio, de seis campos de trufas en los que se investigaron un total de 38 quemados, los cuerpos fructíferos no recolectados representaron el 33% de la producción total (42% al promediar todos los quemados). Esto supone un gran número de trufas, por lo que es de especial relevancia contar con un perro trufero capaz de detectar el mayor número de carpóforos. Del mismo modo, se aconseja intensificar la frecuencia de recolección de trufas, así como adelantar la búsqueda al

mes de septiembre, y retrasarla hasta que no queden trufas en la plantación (abril o mayo dependiendo de las características de la campaña), con la intención de dejar la menor cantidad de alimento en el suelo.

La extracción del mayor número de individuos de *L. cinnamomeus* a la hora de recolectar las trufas es otra medida fundamental para el control esta especie. Es habitual, cuando se localiza un carpóforo en el suelo, que se haga una primera limpieza del mismo in situ, eliminando con la mano los restos de tierra adheridos al peridio. En esta tierra circundante al cuerpo fructífero puede haber un gran número de larvas, huevos y adultos habitando en ella, por lo que es preferible introducir en el zurrón la trufa con tierra y realizar la limpieza fuera de la parcela con la intención de sacar de la misma el mayor número de individuos de *L. cinnamomeus*.

La domesticación de la trufa supuso un punto de inflexión en este aprovechamiento agroforestal. La juventud de la truficultura presenta una importante dualidad.

Por un lado, implica desconocimiento, tanto de la gestión del propio cultivo como de la comercialización, y por supuesto, de las plagas asociadas al mismo. En este sentido, la investigación en este periodo de tiempo se ha centrado principalmente en la mejora de la gestión de las plantaciones truferas, de la planta procedente de vivero, y de alargar la vida útil de los carpóforos. Sin embargo, hasta el momento no se había precisado un estudio intensivo de las plagas y enfermedades asociadas a este cultivo, simplemente porque no existía una amenaza real. Sin embargo, a lo largo de esta última década, la intensificación del aprovechamiento, así como la densificación zonal de las plantaciones han conllevado la aparición de una serie de plagas y enfermedades comunes a las diferentes zonas truferas de la península ibérica. Estos agentes nocivos encuentran en la artificialidad de las plantaciones truferas un ambiente idóneo para su reproducción sin que todavía hayan podido desarrollarse en ellas poblaciones suficientes de organismos capaces de depredar de forma eficiente. De hecho, estos mismos organismos patógenos solo son capaces de producir daños severos en zonas forestales naturales en momentos puntuales cuando encuentran las condiciones óptimas para su reproducción y desarrollo. Por este motivo, se consideró necesario realizar una descripción de los problemas fitosanitarios presentes en plantaciones truferas, ya que la bibliografía existente es muy escasa, y no siempre considera como plagas a organismos que actualmente están comportándose como tal en las plantaciones truferas.

Por otra parte, la juventud de la truficultura supone una oportunidad. La oportunidad de impulsar y fomentar un cultivo que está demostrando ser una alternativa en las zonas más deprimidas de la península ibérica. Las características intrínsecas de este aprovechamiento guían la dirección que debe seguir la gestión de las plantaciones, así como del manejo del producto final. La trufa ha sido considerada por definición un producto ecológico por su recolección en áreas forestales. La domesticación de este hongo debe seguir esta tendencia, y la gestión de plagas y enfermedades también, tratando siempre de identificar el problema antes de que sea generalizado o severo.

El control fitosanitario debe ser llevado a cabo desde la fase de vivero. La calidad de las plántulas inoculadas está determinada no solo por la abundancia de micorrizas sino también por la calidad vegetativa de las plántulas (Fischer y Colinas, 1996). La introducción de organismos nocivos en plantaciones a partir de planta de vivero puede tener consecuencias muy negativas en el sector, debido a la gran dispersión en el territorio que puede tener. Este es el caso por ejemplo del *Candidatus Phytoplasma* causante de las malformaciones tumorales en encina.

Para la comercialización de planta forestal se deben cumplir unos requisitos mínimos marcados por el Real Decreto 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los

materiales forestales de reproducción. En él se afirma que las plantas no se comercializarán “a menos que el 95 por 100 de cada lote sea de calidad cabal y comercial”. La calidad cabal y comercial se determinará en función de las características generales, el estado sanitario y criterios de tamaño.

Cualquier problema fitosanitario que afecte al normal desarrollo de la parte aérea (*Cecidophes tristernalis*, *Aceria ilicis*, *Phyllonorycter belotella*, *Phylloxera quercus*, pulgones o heladas) o de la parte radical de los plántones (*Otiorhynchus sulcatus*) puede causar cuantiosos daños en el vivero afectado debido al rechazo de la Administración, o del propio comprador, con las consecuencias económicas que esto implica.

Sin embargo la falta de calidad fisiológica de las plántulas no solo tiene consecuencias para el viverista. Las plántulas grandes y ricas en nutrientes con alto potencial de crecimiento probablemente tengan un mejor rendimiento en tierras secas con suelos profundos (Cortina *et al.*, 2013), o en las tierras agrícolas donde se establecen generalmente en España las plantaciones de trufas (García-Barreda *et al.*, 2007). Pero en la producción de planta micorrizada, esta calidad no siempre se ha cumplido y ha sido frecuente la comercialización de planta con escaso desarrollo de los brotes y con malformaciones en la raíz pivotante (Chevalier y Grente, 1978; Averseng y Rouch 2001).

No solamente los artrópodos y los daños abióticos pueden afectar al sector viverista. Es de vital importancia la formación de los profesionales. La ausencia de una certificación oficial de la planta micorrizada está provocando una falta de comprobación de la calidad de los plántones comercializados, dejando al consumidor en una posición de indefensión, y debiendo de confiar en el buen hacer del viverista, que no solo debe de realizar planta de calidad micorrícica en cuanto a ápices micorrizados con trufa negra, sino también libre de otros hongos no deseados.

La adquisición de planta con escasa o nula cantidad de micorrizas de *T. melanosporum* puede suponer problemas de adaptación de la planta en campo, siendo un punto fundamental para el éxito de una plantación trufera (Hall *et al.*, 2007). La abundancia de micorrizas de *T. melanosporum* en los primeros años después del establecimiento de la plantación se ha encontrado relacionada positivamente con la abundancia de micorrizas en el vivero y con el rendimiento de la planta después de la plantación en campo (Bourrières *et al.*, 2005, García-Barreda y Reyna, 2013).

La presencia de hongos no deseados en las plántulas inoculadas debido a una incorrecta selección del inóculo está suponiendo un problema en el sector. La introducción de un carpóforo de otra especie puede contaminar toda la planta de la campaña. Si el material con el que este inóculo contaminado no es correctamente desinfectado o retirado de las instalaciones, este error puede ser arrastrado en años sucesivos, por lo que la comprobación microscópica de todos los cuerpos fructíferos a emplear como inóculo es imprescindible.

Además, las condiciones estériles presentes en los viveros de producción de planta micorrizada favorecen la aparición de hongos pioneros, como puede ser *Pulvinula constellatio* o *Sphaerospora brunnea*. Estos organismos, debido a su naturaleza simbiótica, son promotores del crecimiento y la salud de las plantas. Sin embargo, en viveros de producción de planta micorrizada actúan como competidores, disminuyendo la calidad del producto final. Desde este punto de vista, se pueden estudiar y tratar como hongos patógenos y se deben desarrollar estrategias de control para contenerlos (Sánchez *et al.*, 2014). En el caso de *S. brunnea*, la presencia de micorrizas de estos hongos en las raíces de los plantones es asumida como “frecuente y normal”, por lo que el viverista debe convivir con ellos, y conocer su biología para poder disminuir el inóculo en las instalaciones. En el caso de *S. brunnea* por ejemplo, una disminución de la humedad y temperatura en el vivero, así como un descenso de la aireación suelen ser suficientes para bajar su población (Sánchez *et al.*, 2014a).

Sin embargo, esta forma de manejo no parece ser suficiente en el caso de *P. constellatio*. Se trata de un hongo ascomiceto que se encuentra con frecuencia en asociación con briofitos en zonas quemadas (Dennis, 1968; Breitenbach y Kränzlin, 1984). Y aunque en otros países la presencia de este hongo es frecuente en viveros (Amicucci *et al.*, 2001; Trocha *et al.*, 2006; Iotti *et al.*, 2012; Marozzi *et al.*, 2017; Marozzi *et al.*, 2019), en España hasta este momento no había sido descrita en este tipo de instalaciones.

El daño real aún no se ha cuantificado económicamente, pero otros países, en los que este hongo está tradicionalmente ligado al cultivo de planta micorrizada con *Tuber*, lo describen como un hongo competidor oportunista y muy agresivo (Bencivenga *et al.*, 1995). Cabe destacar que los cinco métodos de evaluación de planta micorrizada publicados que se emplean con mayor frecuencia en Europa (Chevalier y Grente, 1978; Govi *et al.*, 1995; Fischer y Colinas, 1996; Palazón *et al.*, 1999; Reyna *et al.*, 2000) ostentan un límite superior para los contaminantes micorrícicos. En el presente trabajo se han observado porcentajes muy elevados de micorrización por *P. constellatio* (llegando a superar el 40%), que siguiendo las directrices de estos métodos comprometerían la validez comercial de los lotes, no permitiendo que éstos superen los controles de calidad.

En España en el año 2014 había 27 viveros en los que se producía un promedio total de 250.000 plantones micorrizados con trufa por año (Reyna y García-Barreda, 2014). De esta manera se considera importante que los propietarios de invernaderos presten atención a la formación de apotecios de *P. constellatio* y comuniquen su presencia para evaluar su grado de propagación. Esto es independiente de la especie de trufa inoculada, y de la especie vegetal empleada, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos, la aparición de micorrizas de *P. constellatio* no está relacionada con estos parámetros, sino con la cantidad de ápices colonizados por *Tuber* cuando se produce el ataque de *P. constellatio*.

Sin embargo, la observación de carpóforos en los contenedores de planta micorrizada en el vivero puede no ser suficiente para la detección de este hongo competidor. De acuerdo a los

resultados obtenidos, aunque las cifras más bajas de carpóforos de *P. constellatio* coinciden con los valores inferiores de micorrizas de esta especie, esto no siempre se cumple para los valores más elevados. En el caso de la planta más joven del invernadero, con un año de edad, los resultados de este trabajo prevén un valor por encima del 40% de micorrizas de *P. constellatio*, pero un valor bajo de carpóforos. Esto puede ser debido a que toda la planta del invernadero se levantó en primavera de 2016, cuando la planta más joven tenía un año de edad, y solamente se habían detectado apotecios en sus contenedores una vez, en el periodo comprendido entre agosto y noviembre.

De acuerdo al carácter de colonizador pionero de *P. constellatio*, así como de *S. brunnea*, se aconseja a los viveristas del sector que mantengan planta no micorrizada en sus instalaciones, preferiblemente a la entrada de los túneles, y entre diferentes lotes de plantas para observar a lo largo de la campaña sus raíces y verificar que no hay presencia de hongos competidores en ellas, pudiendo de este modo detectar un ataque de hongos contaminantes y poder tomar medidas antes de que la contaminación sea generalizada.

El origen de la contaminación por *P. constellatio* en el invernadero en el que se produjo el foco es incierto, aunque tratándose de un invernadero antiguo, en el que tradicionalmente se había dedicado a la inoculación de plata micorrizada con *T. melanosporum* y nunca se había detectado esta contaminación, todo hace indicar que llegó de forma fortuita en alguno de los materiales empleados para la inoculación. Posiblemente este origen se encuentre en la turba empleada, ya que fue el único elemento que no se desinfectó correctamente y fue capaz de colonizar todo el vivero, incluso habiendo desinfectado las instalaciones cada año con hipoclorito de sodio entre las estaciones de producción de la planta.

Para evitar la aparición de otros hongos contaminantes, como por ejemplo *Trichophaea woolhopeia* o el Complejo *Tuber albidum* es necesario realizar una correcta desinfección del sustrato, sobre todo si se emplea tierra en la mezcla. En estos casos el problema no reside únicamente en la disminución de calidad micorrícica de los lotes afectados, sino en su permanencia en campo. Estas especies son capaces de perdurar en campo (De Miguel *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2014a), ocupando ápices que ya no van a ser colonizados por *T. melanosporum*.

En la fase de plantación se han identificado un gran número de agentes nocivos. Sin embargo, pocos de ellos se consideran un problema generalizado en la actualidad. Entre las plagas capaces de afectar al pie simbiote destacan *Kermes vermilio* y *Kermes ilicis* y las malformaciones tumorales identificadas como *Candidatus phytoplasma*. Si se demostrara la relación entre ambos, identificando a *Kermes* sp. como agente vector del fitoplasma, sería necesario trabajar en el control de estas especies.

Sin embargo, se debe de tener precaución con la forma de control de insectos plaga. En el caso de *Kermes*, el control químico del insecto estaría justificado si no se encontraran métodos de lucha biológica eficientes, ya que no solamente causa un importante debilitamiento de la

planta, sino que también por su forma de alimentación puede ser un potencial transmisor de enfermedades como virus y fitoplasmas. Históricamente se trata de cochinillas con poca relevancia como plagas en el ámbito forestal. En Italia se documentó el primer ataque intenso en varias localidades de la Toscana en 1989 (Belcari y Minnocci, 1989) en parques, jardines y zonas urbanas, parajes en los que también ha causado problemas en España (Rodrigo *et al.*, 2013). En zonas forestales se han identificado daños en Granada, Tarragona, Girona, Baleares, Navarra o Aragón entre otras (MAPAMA, 2017), y en la actualidad están provocando daños intensos también en plantaciones trufas.

Una alternativa ecológica de control de estas especies, extrapolable a cualquier otro insecto plaga, sería el empleo de los enemigos naturales asociados a cada especie. En el caso de *Kermes* existe evidencia de que los enemigos naturales asociados a esta plaga son abundantes (Romeo 2013; Maral y Boru, 2018). Sin embargo, su capacidad de control ante niveles de plaga sigue siendo desconocida. Posiblemente el establecimiento de una propuesta de control integrado de esta especie, así como de otras muchas en plantaciones trufas debería incluir la presencia de plantas auxiliares en los cultivos, ya que éstas proporcionarían refugio y alimento a los organismos beneficiosos capaces de controlar poblaciones de insectos plaga, permitiendo el establecimiento de poblaciones estables. Esto puede realizarse mediante la plantación de plantas refugio en los alrededores de la parcela, o bien implantando un sistema de agricultura mixta en el que se realice el aprovechamiento de *T. melanosporum* junto con las especies que se concluyan útiles para el desarrollo de fauna auxiliar. Actualmente hay investigaciones llevándose a cabo en este aspecto, y se espera en un periodo corto de tiempo tener resultados aplicables al territorio.

Aunque *Kermes* y los tumores son los daños considerados como más relevantes, el resto de organismos pueden causar daños intensos muy puntuales en un momento dado, y casi siempre debido a un vacío ecológico debido al uso de fitosanitarios no autorizados. Este es el caso del empleo de piretrinas para el control de *Kermes sp.* Durante unos años fue generalizado el uso de estas sustancias para tratar plantaciones dañadas. Su empleo conllevó la muerte de la fauna auxiliar, provocando un desequilibrio en el medio que supuso una explosión demográfica de la plaga en años posteriores, y poniendo de manifiesto una vez más la importancia de la fauna auxiliar para alcanzar el equilibrio fitosanitario en las plantaciones trufas. Por este motivo se desaconseja la utilización de fitosanitarios si no existen estudios que confirmen su bondad. Se han llevado a cabo trabajos con productos autorizados (Romeo, 2014) que podrían ser empleados, aunque se necesita intensificar el esfuerzo en la realización de estudios de control de esta plaga.

La identificación de un *Candidatus phytoplasma* como organismo causante de las malformaciones tumorales tiene una gran relevancia en el sector. Por una parte, se pone de manifiesto nuevamente la necesidad de la intensificación de los controles sanitarios y de la necesidad de comunicación y transferencia de información dentro de la administración, y por otra se abre la puerta a estudios sobre los vectores asociados a este organismo.

Se debe realizar un seguimiento de la evolución de la sintomatología de este organismo en las plantaciones afectadas de diferentes edades para ver su evolución en el tiempo. Por ahora, en plantaciones adultas se ha observado el decaimiento y la muerte de las ramas que presentan tumoraciones. Es imprescindible en estos casos la retirada del material dañado para evitar la entrada de patógenos secundarios que aprovechan la debilidad del árbol. Sin embargo, en plantaciones jóvenes de uno o dos años de edad, en las que la tumoración está presente en la base del tronco impidiendo el correcto flujo de savia a la parte aérea, se ha observado un debilitamiento generalizado de la planta, con una pérdida de vigor considerable, un estrés mayor después del trasplante, y en el peor de los casos, la muerte. En estas ocasiones la aplicación de quelato de hierro está proporcionando una solución paliativa a esta sintomatología, mostrando aparentemente respuesta positiva al tratamiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se desconoce el efecto de la aplicación continuada de este fertilizante sobre las micorrizas y la producción de carpóforos, y que ésta no es una solución al problema, sino una mitigación de los efectos del fitoplasma sobre la planta.

En planta joven, síntomas similares a los ocasionados por *Candidatus phytoplasma* (clorosis, falta de vigor y muerte de las plantas) son frecuentes en plantaciones, y son causados por daños abióticos como los derivados de una procedencia inadecuada de la bellota y el uso de especies no adaptadas a la zona de la plantación. Éstos están provocando en algunos casos la inadaptación de la planta, causando crecimientos deficientes y en los casos extremos la muerte de los árboles simbioses (Andivia *et al.*, 2012; Del Campo *et al.*, 2010). Estas especies suelen ser especialmente sensibles a las heladas, motivo por el cual es frecuente, si se ha empleado bellota procedente de climas cálidos, o si se han plantado especies no presentes en el ecosistema circundante a la parcela que, en caso de haber heladas en los meses de marzo, abril o mayo, los nuevos brotes se hielen. Esto provoca un retraso en el crecimiento y una mayor sensibilidad a otros agentes patógenos, principalmente barrenadores, debido a un debilitamiento de la planta. Todo ello conlleva un retraso también en la entrada en producción.

En el caso de los gusanos blancos, al igual que *Vesperus*, los gusanos de alambre u otros organismos, como el hongo *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., es importante que no estén presentes en el suelo donde se va a establecer la plantación trufera, ya que la infestación del cultivo previo es uno de los principales motivos por lo que estos patógenos están presentes en plantaciones truferas. Si el cultivo precedente (principalmente vid, almendros u olivos) ha muerto, es preciso conocer las causas antes de comenzar la plantación trufera, ya que el organismo causante de la muerte de los árboles anteriores puede afectar también al pie simbionte de la trufa negra.

Sin embargo, no solamente son hongos patógenos los que pueden causar problemas en una plantación debido al cultivo precedente o al efecto linde. Si están presentes especies ectomicorrícicas en la vegetación circundante a la plantación en sus raíces habrá hongos capaces de competir e incluso desplazar a *T. melanosporum* del sistema radical.

Teniendo en cuenta la competencia radical que ejercen los pies circundantes sobre los árboles truferos, así como el sombreado que producen en el quemado, se aconseja que la distancia entre el árbol trufero y los pies de especies competidoras sean, al menos, la mayor de las siguientes cifras (Reyna *et al.*, 2004):

- Altura del árbol multiplicada por cuatro
- Altura de los pies competidores multiplicada por tres
- Diez metros

En base a este criterio se desaconseja el establecimiento de una plantación trufera en zonas donde han existido previamente especies ectomicorrícicas, como pinos, encinas, coscojas o quejigos, ya que suponen un foco de contaminación para las plantaciones.

Sin embargo, la vegetación previa no es el único foco de infección con especies diferentes a *T. melanosporum*. Los nidos comienzan a realizarse en edades muy tempranas, añadiendo en la mayoría de las ocasiones inóculo esporal de la especie de trufa deseada.

Esta práctica que en principio puede parecer inocua, puede suponer un grave problema en la plantación si no se realiza adecuadamente. Un gramo de trufa puede contener hasta 7×10^7 esporas (Bernal, 2008). Si por equivocación se introducen en el inóculo de los nidos otros hongos diferentes a *T. melanosporum* se podría estar favoreciendo la contaminación de la plantación con hongos no deseados. Este es un hecho a tener en cuenta sobre todo si se recolectan trufas en monte o si se sospecha que en las plantaciones pudiera haber carpóforos de especies diferentes a *T. melanosporum*.

Los nidos suponen una mejora en la calidad de la trufa obtenida (García-Barreda, 2020), y se ha demostrado en el presente trabajo que esta técnica disminuye la cantidad de carpóforos afectados por las lavas de *L. cinnamomeus*, permitiendo ser una herramienta más para la lucha integrada contra este coleóptero, uno de los principales objetos de preocupación por parte del sector de la truficultura junto con la mosca de la trufa *Helomyza tuberivora*.

Los daños ocasionados por *L. cinnamomeus* en plantaciones truferas son hoy en día una realidad. Se han llevado a cabo trabajos previos para el control de este coleóptero basado en la captura masiva con atrayentes aromáticos (Navarro-Llopis *et al.*, 2019; 2020) con resultados muy positivos. Por este motivo, para realizar las capturas de los adultos de *L. cinnamomeus* en la presente tesis doctoral se ha trabajado con este sistema de control. Los resultados obtenidos permiten aumentar el conocimiento de la biología del insecto con la intención de mejorar la eficacia del trampeo masivo como método de disminución de daños en carpóforos.

Uno de los inconvenientes de este sistema de trampeo es la volatilidad del atrayente, que perjudica la durabilidad del vial. Los resultados del estudio parecen indicar que existe una mayor emergencia de adultos en la franja correspondiente al ocaso, lo que podría enfocar los estudios de mejora del método de capturas a la difusión del atrayente en las horas de máxima captura empleando difusores con temporizador que permitan una mayor difusión en las horas

de máximo vuelo observadas. En el contexto de esta tesis se llevaron a cabo estudios preliminares con trampas con difusor de aromas programados, pero la altura de colocación de las trampas (1 metro) posiblemente dificultó la entrada de los adultos. Sería necesaria una mejora de este trampeo en este sentido, disminuyendo la altura de colocación de las trampas y mejorando la eficacia de los difusores.

Leiodes cinnamomeus es una plaga asociada a *T. melanosporum* y *T. brumale* y no a *T. aestivum* (Arzone, 1971; Callot, 1999; Paccioni y Lalli, 1990; Oliver *et al.*, 1996; Reyna, 2012). Este hecho se corrobora en los trabajos realizados, ya que no se han recolectado adultos de *L. cinnamomeus* en ninguna de las trampas colocadas en la parcela productora de trufa de invierno y trufa de verano, donde sí que se han capturado estos coleópteros en la época de producción de *T. melanosporum*. Este hecho permite focalizar los trabajos de trampeo en los meses de producción de trufa negra, y evitando los meses estivales, en los que el calor favorece la volatilización del atrayente, obligando a su renovación en un corto espacio temporal.

Con todo esto, basándonos en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se establece un protocolo de actuación para disminuir las poblaciones de *L. cinnamomeus* en las parcelas afectadas, basado en la colocación de trampas con atrayente alimenticio a principio de septiembre, la recolección del mayor número de carpóforos intensificando la frecuencia de búsqueda y un buen entrenamiento del perro trufero, la limpieza de los carpóforos fuera del campo, y la realización de nidos en las plantaciones.

Sin embargo, los resultados y la metodología de trabajo empleados en esta tesis doctoral pueden ser extrapolables a otros organismos, y a otras zonas productoras de trufa negra. Es frecuente la existencia de especies vicariantes, organismos que cumplen el mismo papel biológico, pero que habitan en regiones diferentes. Es el caso, por ejemplo de *L. cinnamomeus* en Europa y el “escarabajo de la trufa australiano” en Australia (comúnmente llamado ATB), un coleóptero perteneciente a la familia Nitidulidae que se alimenta de trufas. Su identidad hoy en día no está determinada, aunque se cree que puede tratarse de *Thalycrodes* sp. nr. australe. Al igual que *L. cinnamomeus*, es capaz de causar pérdidas económicas muy importantes. Los trabajos realizados por Learmonth *et al.* (2019) en Australia, en el que emplean un trampeo similar al usado en este proyecto confirman que las trampas son capaces de capturar también a este insecto, por lo que se abren las puertas también en Australia a la captura masiva del ATB como método de control, y empleando este sistema de trampeo para ampliar el conocimiento de esta especie, al igual que se ha hecho en esta tesis doctoral.

Por todo lo comentado con anterioridad, el papel de la investigación en cuestiones fitosanitarias de plantaciones truferas es claro. Se deben conocer los organismos potencialmente peligrosos, su biología, etiología y formas de control para poder intervenir de una forma eficiente en el supuesto de que se desarrollen como plaga. El objetivo final: ser capaces de llevar a cabo acciones de una forma eficiente en caso de que una patología

despunte y se convierta en plaga. El cultivo de la trufa es ecológico por definición (Reyna, 2012). Para tratar de continuar con esta filosofía, cualquier acción llevada a cabo en una plantación trufera para eliminar los organismos perjudiciales debería de seguir los principios de la agricultura ecológica. En el caso de lo posible, se deben aplicar métodos de control agronómicos, biológicos y mecánicos, como contrapartida el empleo de sustancias químicas. La búsqueda del equilibrio en el ecosistema es un objetivo a alcanzar, tratando de favorecer la existencia de fauna auxiliar y consiguiendo un correcto desarrollo de las plantas. Actualmente se está llevando este tipo de control siempre que es posible.

Las características intrínsecas del cultivo de trufa dificultan esta gestión de plagas. La formación de investigadores, técnicos, asesores y truficultores es crucial para esta tarea. Es necesario conocer las técnicas de producción de planta, así como el manejo de los viveros, los requerimientos climáticos y edáficos del hongo y del simbionte, las labores y técnicas culturales que actualmente se desarrollan en las plantaciones, el ciclo biológico de la trufa, los avances en el conocimiento de la microbiota asociada al cultivo de trufa y todas las cuestiones relacionadas con la port cosecha (microorganismos relacionados con pudrición, sistemas de conservación y requerimientos del mercado). Solamente siendo capaz de integrar estos conocimientos se podrá realizar una gestión de plagas eficiente.

CONCLUSIONES:

1.- Han sido identificados un total de 63 agentes nocivos presentes en diferentes fases del cultivo de la trufa.

2.- Se ha detectado por primera vez en un vivero español de producción de planta micorrizada el hongo contaminante micorrícico *Pulvinula constellatio*.

3.- *Pulvinula constellatio* unicamente es competitiva cuando la micorrización previa por *Tuber melanosporum* y *Tuber aestivum* es escasa, independientemente del árbol simbiote.

4.- *Pulvinula constellatio* muestra un comportamiento pionero típico formando estructuras reproductivas en un corto espacio de tiempo, aunque la presencia de carpóforos es una detección tardía de la contaminación.

5.- No se ha conseguido el cultivo *in vitro* de *Pulvinula constellatio* con las condiciones habitualmente empleadas para otros hongos pironematales y ectomicorrícicos. Esto implica ciertas diferencias de comportamiento incluso con especies filogenéticamente próximas.

6.- Se ha identificado mediante técnicas moleculares al agente causal de las malformaciones tumorales de la encina en España como un *Candidatus* Phytoplasma del grupo 16SrX, próximo a *Candidatus* Phytoplasma prunorum.

7.- Los ataques de las cochinillas de la encina *Kermes ilicis* y *Kermes vermilio* podrían estar relacionados con la aparición del *Candidatus* Phytoplasma, lo que orienta futuros estudios hacia la identificación de esta plaga como vector de la enfermedad, así como sus posibilidades de control.

8.- La movilidad de *Leiodes cinnamomeus* aumenta con la humedad del suelo y disminuye con la temperatura exterior, lo que confirma los trabajos desarrollados por otros autores.

9.- El periodo máximo de daño por *Leiodes cinnamomeus* en los carpóforos coincide con el periodo de máximo valor de la trufa.

10.- *Leiodes cinnamomeus* parece tener el comportamiento de vuelo crepuscular habitual en otros coleópteros.

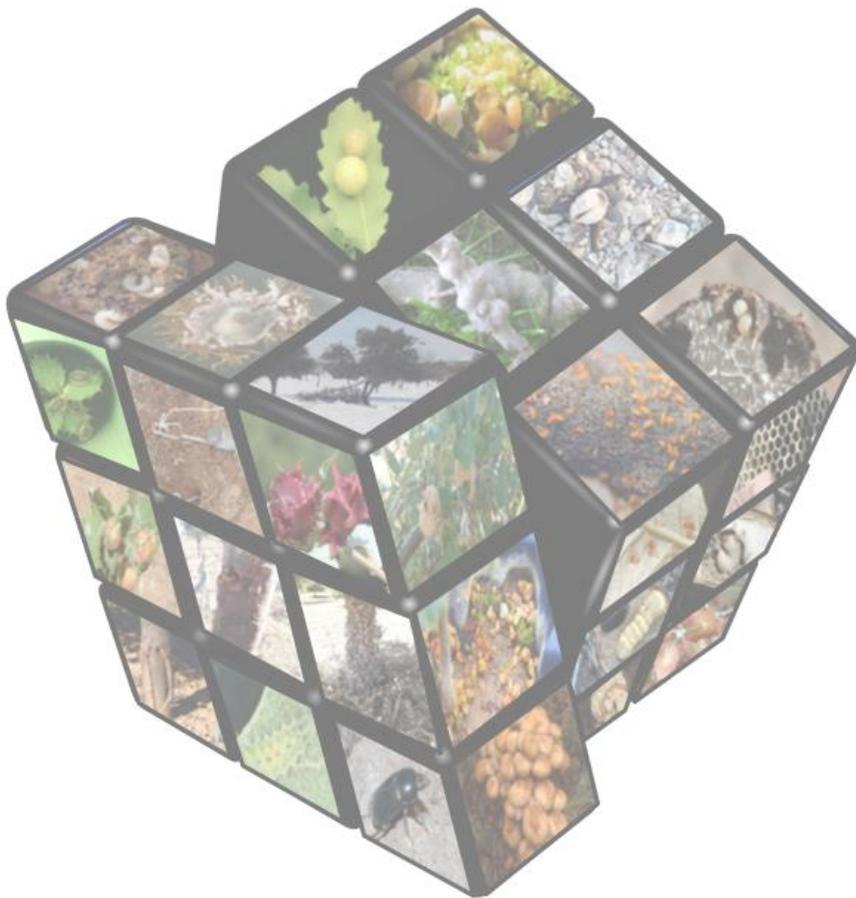
11.- Ambos sexos de *Leiodes cinnamomeus* se ven atraídos por igual por el atrayente empleado en las trampas de captura.

12.- Los machos de *Leiodes cinnamomeus* son más abundantes a principio de la campaña, y las hembras al final de la misma.

13.- *Leiodes cinnamomeus* parece estar únicamente ligado a especies del género *Tuber* de fructificación invernal.

14.- Las condiciones que se generan en los nidos parecen ser desfavorables para *Leiodes cinnamomeus*, lo que permite incorporar esta técnica al control integrado de plagas.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA:

- Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson KH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Ursing BM, Vrålstad T, Liimatainen K, Peintner U, Kõljalg U. 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytol* 186(2): 281-285.
- Abu-Hambeh NH, Reeder RC. 2000. Soil thermal conductivity: effects of density, moisture, salt concentration, and organic matter. *Soil Sci Soc Am J* 64: 1285-1290.
- ACTA. 2016. Guide pratique de défense des cultures. Ed. Acta éditions. 928pp.
- Agerer R. 1987-2011. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag. Munich.
- Agerer R. 1990. Studies on ectomycorrhizae XXIV. Ectomycorrhizae of *Chroogomphus helveticus* and *C. rutilus* (Gomphidiaceae, Basidiomycetes) and their relationship to those of *Suillus* and *Rhizopogon*. *Nova Hedwiga* 50: 1-63.
- Agerer R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 23: 25-73.
- Agerer R, Rambold G. 2004-2020. (first posted on 2016-02-11; most recent update: 2020-01-01). DEEMY-an information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. www.deemy.de - München, Germany. En línea, consultado el 2 de Junio de 2020.
- Agerer R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizas. *Mycol Prog* 5: 67-107.
- Agrios G. 1998. Fitopatología. Ed. Limusa, México. 838 pp.
- Águeda B, Fernández-Toirán LM, De Miguel AM, Martínez-Peña F. 2010. Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *For Syst* 19(1): 89-97.
- Ahrens U, Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA Gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Albisu LM, Herrando E, Meza L, Barriuso JJ. La trufa negra en España: organización de sus mercados. <http://hdl.handle.net/10532/3567>.
- Alexopoulos C, Mims C. 1985. Introducción a la Micología. Ediciones Omega S.A. 660 pp.
- Aljanabi SM, Parmessur Y, Moutia Y, Saumtally S, Dookun A. 2001. Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. *Plant Pathol* 50: 628-636.
- Alma A, Bosco D, Danielli A, Bertaccini A, Vibio M, Arzone A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol Biol* (6): 115-121.
- Alonso-Ponce R, Águeda B, Ágreda T, Alonso J, García MA, Pérez-López M, Melgar MJ. 2004. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. *Rev Toxicol* 21: 11-15.

- Alonso Ponce R, Águeda B, Ágreda T, Modrego MP, Aldea J, Martínez-Peña F. 2010. Un modelo de potencialidad climática para la trufa negra (*Tuber melanosporum*) en Teruel (España). *For Syst* 19(2): 208-220.
- Alvarado M, Serrano A, Durán JM, de la Rosa A. 1996. Problemática de los gusanos blancos (*Coleoptera, Scarabaeidae*) en el olivar de la provincia de Sevilla. *Bol San Veg Plagas* 22: 319-328.
- Amicucci A, Zambonelli A, Guidi C, Stocchi V. 2001. Morphological and molecular characterisation of *Pulvinula constellation* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Letters* 194 (2): 121-125.
- Andivia E, Fernández M, Vázquez-Piqué J, Alejano R. 2012. Two provenances of *Quercus ilex* ssp. *Ballota* (Desf) Smp. nursery seedlings have different response to frost tolerance and autumn fertilization. *Eur J Forest Res* 131: 1091-1101.
- Andrés-Alpuente, A, Sánchez S, Martín-Santafé M, Aguirre J, Barriuso JJ. 2014. Comparative analysis of different methods for evaluating evergreen oaks mycorrhized with black truffle. *Mycorrhiza* 24(Suppl 1): 29-37.
- Argo WR. 1998. Root Medium Physical Properties. *Horttechnology* 8: 481-485.
- Arzone A. 1970. Reperti ecologici ed etologici di *Liodes cinnamomea* Panzer vivente *Tuber melanosporum* Vittadini (Coleoptera Staphylinoidea). *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università Degli Studi di Torino* 5: 317-357
- Arzone A. 1971. Nuovi reperti sulla biologia di *Liodes cinnamomea* Panzer in *Tuber mgnatum* Pico (Coleoptera Staphylinoidea). *Allionia* 17: 11-129
- Averseng P, Rouch P. 2001. Quatre étapes de l'amélioration d'un produit au travers d'un quart de siècle de coopération entre l'INRA et Agri-Truffe (Four steps for the improvement of a product in a quarter of century of cooperation between INRA and Agri-Truffe). En: *Proceedings of the "Vè Congrès International Science et Culture de la Truffe"* (Sourzat P ed). Aix-en-Provence (France), 4-6 March 1999. Fédération Française des Trufficulteurs, Marseille, France, pp. 293-295.
- Ayres PG, Boddy L. (Eds). 1986. *Water, Fungi and Plants*. Cambridge University Press, Cambridge. 413 pp.
- Baciarelli-Falini L, Rubini A, Riccioni C, Paoloci F. 2006. Morphological and molecular analices of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza* 16: 475-484.
- Balachowsky AS. 1962. *Entomologie appliquée à l'agriculture*. Tome I Coléoptères, premier vol. Ed Masson et Cie, Paris. 564pp.
- Baranowski R. 1993. Revision of the genus *Leiodes* Latreille of North and Central America (Coleoptera: Leiodidae). *Entomol Scand* 42 (suppl): 1-149.
- Barnett HL, Hunter BB. 1999. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4ª Ed. APS Press. USA. 218 pp.

- Barriuso J, Martín-Santafé M, Sánchez S, Palazón C. 2012. Plagas y enfermedades asociadas al cultivo de la trufa. En: Reyna S (ed) Truficultura. Fundamentos y Técnicas (2). Ed Mundi-Prensa, Madrid. pp 275-301.
- Barriuso J, Serrano-Notivol R, Martín-Santafé M, Lahoz B, García-Barreda S, Marco P, Cuadrat JM, Sánchez S. 2016. Cultivated area and cultivation potentiality of black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) in Teruel province (east-central Spain). 8th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (IWEMM8). Cahors, Francia.
- Bedding RA, Miller LA. 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in potted plants. *Ann Appl Biol* 99: 211-216.
- Bencivenga M, Di Massimo G, Donnini D, Tanfulli M. 1995. Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene. Nota 1-Inquinanti in vivaio. *Micol Ital* 2: 167-178.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2009. GenBank. *Nucleic Acids Research* 37: D26-D31.
- Benucci GMN, Haridas S, LaButti K, Marozzi G, Antonielli L, Sanchez S, Marco P, Wang X, Barry K, Lipzen A *et al.* 2019. Draft Genome Sequence of the Ectomycorrhizal Ascomycete *Sphaerospora brunnea*. *Microbiology Resource Announcements* 8 (50) e00857-19.
- Berges R, Rott M, Seemüller E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90: 1145-1152.
- Bernal J. 2008. Obtención de micelio de *Tuber melanosporum* "in vitro". Trabajo Fin de Carrera Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Zaragoza. 63 pp.
- Bertaccini A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front Biosci* 12: 673-689.
- Biosca EG, Gonzalez R, Lopez-Lopez MJ, Soria S, Montón C, Pérez-Laorga E, López MM. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology* 93(4): 485-92.
- Bonal R, Muñoz A, Díaz M. 2007. Satiation of predispersal seed predators: the importance of considering both plant and seed levels. *Evol Ecol* 21: 367-380.
- Bonet JA, Fischer CR, Colinas C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agron Sust Develop* 26: 69-76.
- Bonito G, Trappe JM, Vilgalys R. 2009. North American truffles in the Tuberaceae: molecular and morphological perspectives. *Acta Bot Yunnan* 31(S16): 39-51.
- Bonito G, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R. 2010. A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Mol Ecol* 19: 4994-5008.
- Bourrières D, Coves H, Tixier R, Ricard JM. 2005. Effects of the initial level of mycorrhization of young plants inoculated with *Tuber melanosporum*. En: Abstracts book of "IV International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (IWEMM4)". Murcia (Spain) 28 Nov - 2 Dic 2005. Universidad de Murcia, Murcia, Spain. pp. 32.

- Bové JM, Renaudin J, Saillard C, Foissac X, Garnier M. 2003. *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute : relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. Annual review of Phytopathology 41: 482-500.
- Bowen GD. 1994. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. Plant Soil 159: 61-67.
- Bratek Z, Papp O, Merkl L, Ádám L, Takács V. 1992. Insects living in truffles. Micol Veget Medit 1: 103-107.
- Braun U. 1995. The powdery mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fischer Verlag, Jena. 337pp.
- Braun U, Shi A, Mmbaga M, Takamatsu S, Divarangkoon R, Chen P. 2007. *Erysiphe abbreviata* on Cherry Bark Oak: Morphology, Phylogeny and Taxonomy. Mycologia 99(5): 655-663.
- Breitenbach J, Kränzlin K. 1984. Champignons de Suisse, vol.1, Les Ascomycetes. Edition Mykologia, Lucerne. 310 pp.
- CABI BIOSCIENCES. 2011. Sección de taxonomía de hongos. En línea, consultada en febrero de 2019. www.indexfungorum.org.
- Cairney JWG. 1991. Rhizomorphs: organs of exploration or exploitation. Mycologist 5: 5-10.
- Callot G. (Coord.). 1999. La truffe, la terre, la vie. Ed. INRA Editions, Versailles. 210pp.
- Capecchi M, Vecchiati P, Zambonelli A. 1999. Dinamica della micorrizzazione in due tartufoie sperimentali di *Tuber magnatum* Pico in provincia di Modena. Micol Ital 17: 9-18.
- Casteels H, De Clercq R. 1988. Observations on weevil pests in nurseries. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 53: 1169-1174.
- Castel L. 2012. Artrópodos parásitos asociados a carpóforos del género *Tuber*. Proyecto final de carrera. Universidad de Zaragoza. Escuela Politécnica Superior de Huesca.
- Čejka T, Trnka M, Krusic PJ, Stobbe U, Oliach D, Václavík T, Tegel W, Büntgen U. 2020. Predicted climate change will increase the truffle cultivation potential in central Europe. Sci Rep 10(1): 21281.
- Chen Y, Seybold SJ. 2014. Crepuscular Flight Activity of an Invasive Insect Governed by Interacting Abiotic Factors. PLoS ONE 9(8): e105945.
- Chevalier G, Grente J. 1978. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: Production a grande échelle de plantes mycorhizes par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). Mushroom Sci 10: 483-505.
- Chevalier G, Giraud M, Bardet MC. 1982. Interactions entre les mycorrhices de *Tuber melanosporum* et celles d'autres champignons ectomycorhiziens en sols favorables à la truffe. En: INRA (ed) Les Mycorrhices: biologie et utilisation, col 13. Les Colloques de l'INRA, Paris, pp 313-321.
- Chevalier G, Poitou N. 1990. Study of important factors affecting the mycorrhizal development of the truffle fungus in the field using plants inoculated in nurseries. Agric Ecosyst Environ 28: 75-77.
- Chevalier G, Frochot H. 1997. La truffe de Bourgogne. Ed Pétrarque, Levallois-Perret, France. 258pp.

- Chevalier G, Pargney JC, 2014. Empirical or rational truffle cultivation? It is time to choose. *For Syst*, 23(2): 378-384.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1175-1184.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* 10: 526-535.
- Clavería V. 2007. Estudio de la comunidad ectomicorrícica de un bosque maduro de *Quercus ilex* subsp. *ballota*, su caracterización y dinámica espacio-temporal. Tesis Doctoral (inérita). Departamento de Botánica, Universidad de Navarra. 357 pp.
- Cobos, JM, Montoya R, Tuset JJ. 1993. New damage to the *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*. International Congress "Recent Advances in Studies on Oak Decline". Selva di Fasano, Brindise, Italia, 13-18 Septiembre 1992.
- Coca M. 2009. De Gusano blanco a Escarabajo Sanjuanero (Coleoptera, Scarabaeidae). Características morfológicas, modo de vida e incidencia en cultivos. *Bol Soc Entomol Aragonesa* 44: 581-586.
- Cocina L, Barriuso JJ, Martín-Santafé M, Sánchez S. 2013. A review of nurseries producing mycorrhizal plants in Spain and in the world. Presentación en póster. I Congreso Internacional de Truficultura 2013. Teruel, España.
- Colgan W, Claridge AW. 2002. Mycorrhizal effectiveness of *Rhizopogon* spores recovered from faecal pellets of small forest-dwelling mammals. *Mycol Res* 106: 314320.
- Colinas C, Capdevila JM, Oliach D, Fischer CR, Bonet JA. 2007. Mapa de aptitud para el cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Catalunya. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Solsona, España. 134 pp.
- Constable FE, Gibb KS, Symons RH. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathol* 52: 267-276.
- Cooter J. 1996. Annotated keys to the British Leiodinae (Col., Leiodidae). *Entomol Monthly Magazine* 132: 205-272.
- Cortina J, Peñuelas JL, Puértolas J, Savé R, Vilagrosa A. 2006. Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Ed.: Organismo Autónomo Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. 191 pp.
- Cortina J, Vilagrosa A, Trubat R. 2013. The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New Forests* 44: 719-732.
- Coutin R. 1989. Truffes et mouches rabbassieres. *Insectes* 75: 6-8.
- Danielson RM. 1984. Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerospora brunnea* (Pezizales). *Mycologia* 76: 454-461.
- De la Varga H, Le Tacon F, Lagouet M, Todesco F, Varga T, Miquel I, Barry-Etienne D, Robin C, Halkett F, Martin F, Murat C. 2017. Five years investigation of female and male genotypes in

- périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies. *Environ microbiol* 19(7): 2604-2615.
- De Liñán C. (coord.). 1998. Entomología agroforestal. Insectos y ácaros que dañan montes, cultivos y jardines. Ed. Agrotécnicas S.L. España. 1309 pp.
- De Miguel AM, de Román M, Etayo ML. 2001. Mycorrhizal fungi competing with *Tuber melanosporum* Vitt. in cultivated truffle beds in NE Spain. En: Proceedings of the II International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms. Christchurch (Nueva Zelanda), Julio 2001.
- De Miguel AM, Sáez R. 2005. Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas. *Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica*, 16: 1-18.
- De Miguel AM, Águeda B, Sánchez S, Parladé J. 2014. Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza* 24(1): 5-18.
- De Román M, De Miguel AM. 2001. Identification and description of natural mycorrhizae in a potential truffle-occurring area in Navarra (Spain). *Actes du V Congrès International Science et Culture de la Truffe, Aix-en-Provence, Francia*. pp 8.433-8.436. ISBN: 2-9517296-X.
- De Román M, Boa E. 2003. Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. *Mic apli int* 16 (2): 25-33.
- De Román, M. 2003. Las ectomicorrizas de *Quercus ilex* subsp. *ballota* y su dinámica post-incendio en una zona potencialmente trufera. Tesis doctoral (inérita). Departamento de botánica, Universidad de Navarra. 488 pp.
- Del Campo A, Navarro R, Ceacero C. 2010. Seedling quality and field performance of commercial stocklots of containerized holm oak (*Quercus ilex*) in Mediterranean Spain: an approach for establishing a quality standard. *New Forests* 39 (1): 19-37.
- Del Estal P, Nieves-Aldrey JL, Pujade-Villar J. 2006. Agallas sobre quercineas. Informaciones técnicas. Dirección General Del Medio Natural del Gobierno de Aragón. Servicio de Coordinación y Planificación Forestal.
- Deng S, Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Meth* 14: 53-61.
- Dennis RWG. 1968. *British Ascomycetes* (Cramer, J., Ed.). Belser, Stuttgart.
- Di Massimo G, García-Montero LG, Manjón JL, Díez J. 1996. Hongos micorrícicos competidores de *Tuber nigrum* Bull (= *T. melanosporum* Vittad.), presentes en ecosistemas naturales y viveros del centro de España. *Bol Soc Micol Madrid*, 21: 189-199.
- Du Merle P. 1998. Egg development and diapause: ecophysiological and genetic basis of phenological polymorphism and adaptation to varied hosts in the green oak tortrix, *Tortrix viridiana* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *J Insect Physiol* 45: 599-611.
- Egger KN. 1986. Substrate hydrolysis patterns of post-fire Ascomycetes (Pezizales). *Mycologia* 78: 771-780.
- Egger KN. 2006. The surprising diversity of ascomycetous mycorrhizas. *New Phytol* 170: 421-42.

- Elen J. 2007. WA truffles in black gold rush. The Herald Sun, Australia, 14 julio.
- Eslick H. 2012. Identifying the Cause of Rot in Black Truffles and Management Control Options. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 12/005, 46pp.
- Estrada-Venegas E, Acuña-Soto JA, Equihua-Martínez A, Mederos J, Pujade J. 2016. Primeras citas fidedignas del género *Aceria* Asociado a *Quercus ilex* L. y *Q. coccifera* L. para el nordeste de la Península Ibérica. Folia Entomol Mex 2 (2): 24-32.
- Etayo ML, de Miguel AM. 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Olóriz, Navarra. Publicaciones de biología. Universidad de Navarra. Serie botánica, 11: 55-114.
- Etayo ML, De Miguel AM, De Román M. 1999. Ectomycorrhizae occurring in hazel (*Corylus avellana* L.), oak (*Quercus faginea* Lam.) and evergreen oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) in a cultivated bed along 4 sampling years. Publicaciones de biología. Universidad de Navarra. Serie botánica 12: 13-22.
- Etayo ML. 2001. Seguimiento del estado de micorrización de una parcela de cultivo de trufa negra. Valoración del simbionte arbóreo y efecto del tratamiento de acolchado. Estudio preliminar de las micorrizas de un área trufera colindante. Tesis Doctoral (inédita). Departamento de Botánica, Universidad de Navarra. 361 pp.
- Evans MEG. 1972. The jump of the click beetle (Coleoptera, Elateridae): a preliminary study. J Zool 167: 319-336.
- Fachinetti R, Pedemonte ML, Grilli MP. 2015. Tiempo de desarrollo y supervivencia de *Arhopalus syriacus* (Reitter) (Coleoptera: Cerambycidae), una plaga potencialmente perjudicial de *Pinus* sp. en Argentina. Agriscientia 32(2): 95-105.
- Fischer C, Colinas C. 1996. Methodology for certification of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum* for commercial application. 1st International Conference on mycorrhizae, Berkeley.
- Frago E, Guara M, Pujade-Villar J, Selfa J. 2010. Winter feeding leads to a shifted phenology in the browntail moth *Euproctis chrysorrhoea* on the Evergreen strawberry tree *Arbutus unedo*. Agr forest entomol 12: 381-388.
- Frank JL, Anglin S, Carrington EM, Taylor DS, Viratos B, Southworth D. 2008. Rodent dispersal of fungal spores promotes seedling establishment away from mycorrhizal networks on *Quercus garryana*. Botany 87(9): 821-829.
- Fraival A. 1998. Encyclopédie des ravageurs européens [on line]. HYPPZ, HYP3. INRA, (France). Available in <http://www7.inra.fr/hyppz/>. En línea, consultado el 4 de febrero de 2019.
- Fries N, Swedjemark G. 1985. Sporophagy in Hymenomycetes. Experimental Mycology 9: 74-79.
- Fuentes C, Martín-Santafé M, Morton A, García del Pino F. 2019. Susceptibilidad del escarabajo de la trufa, *Leiodes cinnamomea*, a los nematodos entomopatógenos. Poster. XI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Madrid. Noviembre 2019.
- García-Barreda S. 2011. Avances en la selvicultura de bosques mediterráneos productores de trufa negra. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

- García-Barreda S, Reyna S, Pérez-Badía R, Rodríguez-Barreal JA, Domínguez-Núñez JA. 2007. Ecología de la trufa y las áreas truferas. En: "Truficultura: Fundamentos y Técnicas" (Reyna S ed). Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, pp. 153-208.
- García-Barreda S, Reyna S. 2013. Cultivation of *Tuber melanosporum* in firebreaks: short-term persistence of the fungus and effect of seedling age and soil treatment. *Fungal Biol* 117: 783-790.
- García-Barreda S, Molina-Grau S, Forcadell R, Sánchez S, Reyna S. 2017. Long-term soil alteration in historical charcoal hearths affects *Tuber melanosporum* mycorrhizal development and environmental conditions for fruiting. *Mycorrhiza* 27: 603-609.
- García-Barreda S, Marco P, Martín-Santafé M, Tejedor-Calvo E, Sánchez S. 2020. Edaphic and temporal patterns of *Tuber melanosporum* fruitbody traits and effect of localised peatbased amendment. *Sci Rep* 10, 4422.
- García-Chapa M, Laviña A, Sanchez I, Medina V, Batlle A. 2003a. Occurrence, symptom expression and characterization of phytoplasma associated with Pear decline in Catalonia (Spain). *J Phytopatol* 151: 584-590.
- García-Chapa M, Medina V, Viruel MA, Laviña A, Batlle A. 2003b. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52: 513-520.
- García-Chapa M, Sabaté J, Laviña A, Batlle A. 2005. Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *Eur J Plant Pathol* 111: 9-17.
- García-Marí F, Costa J, Ferragut F, Laborda R. 1989. Plagas agrícolas. Ácaros e insectos exopterigotos. Departamento de producción vegetal. Universidad politécnica Valencia. Servicio de publicaciones. 209 pp.
- García-Montero LG, Galán R, Massimo G, Manjón JL, Díez J. 1997. *Sphaerospora brunnea* (Alb. et Schwein) Svrcek et Kubicka, un discomicete con incidencia en la truficultura e interés forestal. *Revista Catalana de Micología* 20: 99-104.
- García-Montero LG, Pérez Andueza G, Díaz P, Manjón JL. 2004. Contribution to ecological knowledge of herbivorous flies (Diptera: Heleomyzidae) on truffles in Spain. *Bol San Veg Plagas* 30: 679-683.
- García-Montero LG, Di Massimo G, Manjón JL, García-Cañete J. 2008. Effect of *Sphaerospora brunnea* mycorrhizas on mycorrhization of *Quercus ilex* × *Tuber melanosporum*. *N Z J Crop Hortic Sci* 36 (3): 153-158.
- Garland F. 1999. Growing *Tuber melanosporum* under adverse acid soil conditions in the United States of America. En: Abstracts of the Vth international congress, science and cultivation of truffles 1999. Aix on Provence, France, p 46.
- Garrido Vivas, A. 1984 Bioecología de *Capnodis tenebrionis* L. (Coleop: Buprestidae) y orientaciones para su control. *Bol Serv Plagas* 10: 205-221.
- Gebhardt S, Neubert K, Wöllecke J, Münzenberger B, Hüttl RF. 2007. Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza* 17: 279-290.

- Genard M, Lescourret F, Durrieu G. 1986. Mycophagie chez le sanglier et dissémination des spores de champignons hypogés. *Gaussenia* 2: 17-23.
- Genard L, Winkowska L, Konrady M, Ryšán P. 2016. Apple mosaic virus. *Phytopathol Medit* 55 (1): 1-19.
- Giraud M. 1988. Prélèvement et analyse de mycorhizes. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes CTIFL (ed) *La Truffe* 10: 49-63.
- Gnaneswaran S, Wijayagunesakara NP. 1999. Survey and identification of insect pests of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) culture in central province of Sri Lanka. *Trop Agr Res Ext* 2 (1): 21-25.
- Govi G, Bencivenga M, Granetti B, Pacioni G, Palenzona M, Tocci A, Zambonelli A. 1995. Presentazione del metodo di valutazione delle piante micorrizzate con funghi del gen. *Tuber* basato sulla caratterizzazione morfologica delle micorrize. Regioni: Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Toscana, Umbria, Lazio, Molise, Abruzzo. Bollettino Ufficiale Della Regione Toscana n. 24 del 30.4.1996.
- Granetti B, Angelini P. 1992. Competizione tra alcuni funghi ectomicorrizici e *T. melanosporum* in una tartufaia coltivata. *Micol Vegetazione Mediterr* 7: 173-188.
- Grünwald NJ, LeBoldus JM, Hamelin RC. 2019. Ecology and Evolution of the Sudden Oak Death Pathogen *Phytophthora ramorum*. *Annu Rev Phytopathol* 57(1): 301-321.
- Guillaumin JJ, Legrand P. 2013. *Armillaria* root rots. En: P. Gonthier & G. Nicolotti (Eds.), *Infectious forest diseases*. pp. 159-177.
- Gundersen DE, Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35: 144-151.
- Guy A, Kapranas A, Griffin CT, Gaffney M. 2017. Conditioning the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis megidis* by pre-application storage improves efficacy against black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) at low and moderate temperatures. *Biol control* 108: 40-46.
- Hall IR. 1996. The New Zealand perigord black truffle programme-the first decade. En: *Abstracts of the 1st International Conference on Mycorrhiza, Berkley, USA*, pp 58-59.
- Hall IR, Wang Y. 1998. Methods for cultivating edible ectomycorrhizal mushrooms. En: Varma A (ed) *Mycorrhiza manual*. Springer, Berlin, pp 99-114.
- Hall IR, Wang Y. 2003. Culture de la truffe noire du Périgord en Nouvelle-Zélande sur sols naturellement acides, amendes. (Cultivation of the Périgord black truffle in New Zealand on limed naturally acidic soils). *Résumés des interventions, Journée nationale de la trufficulture*. 28 March 2003, Cuzance, pres de Martel, Lot. CTIFL, Paris, pp 3-8.
- Hall IR, Brown G, Zambonelli A. 2007. *Taming the truffle: The history, lore, and science of the ultimate mushroom*. Timber Press. 304 pp.
- Hall IR, Brown GT, Zambonelli A. 2009. *Trufas.: historia, ciencia, cultivo y recolección: con las últimas investigaciones y experiencias*. Ed. Tutor. 304pp.

- Halliday RB, Majka CG. 2010. Clarification of the status of the Genus names *Leiodes* Latreille 1796 (Coleoptera), *Liodes* von Heyden 1826 (Acari) and *Neoliodes* Berlese 1888 (Acari). *Zootaxa* 2600: 61-65.
- Hansen K, Perry BA, Dranginis AW, Pfister DH. 2013. A phylogeny of the highly diverse cup-fungus family Pyronemataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationships and evolution of selected life history traits. *Mol Phylo Evol* 67: 311-335.
- Hansson BS. 2002. A bug's smell-research into insect olfaction. *Trends Neurosci* 25: 270-274.
- Hardham AR. 2005. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol plant pathol* 6(6): 589-604.
- Hardham AR, Blackman LM. 2018. *Phytophthora cinnamomi*. *Mol plant pathol* 19(2): 260-285.
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508.
- Hochberg ME, Bertault G, Poitrineau K, Janssen A. 2003. Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomol Exp Appl* 109: 147-153.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 9: 403-423.
- Honrubia M, Torres P, Díaz G, Morte A. 1995. Biotecnología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia. 85 pp.
- Honrubia M, Fernández A, Moya D, González A, de las Heras J. 2006. Potencialidad de la trufa negra (*Tuber nigrum* Bull.) en la provincia de Albacete. *Rev Montes* 83: 25-40.
- Hu HT, Wang Y, Hu BY. 2005. Cultivation of *Tuber formosanum* on limed soil in Taiwan. *New Zeal J Crop Hort* 33: 363-366.
- Hutcheson JA. 1980. *Arhopalusferus* (Coleoptera: Cerambycidae): structure and function of the female reproductive system. *N Z J Zool* 7(3): 417-424.
- Hutchison LJ. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.
- Iotti M, Piattoni F, Zambonelli A. 2012. Techniques for host plant inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. En: Zambonelli A, Bonito GM (eds) *Edible ectomycorrhizal mushrooms, current knowledge and future prospects*. Springer-Verlag, Berlin, pp 145-161.
- IRPCM Phytoplasma/Spisoplasma Working Team- Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. "Candidatus Phytoplasma", a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Jarausch W, Lancas M, Dosba F. 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *J Phytopathol* 147: 47-54.
- Johnson CN. 1994. Nutritional ecology of a mycophagous marsupial in relation to production of hypogeous fungi. *Ecology* 75: 2015-2021.

- Johnson KS, Scriber JM, Nitao JK, Smitley DR. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki to Three Nontarget Lepidoptera in Field Studies. *Environl Entomol*, 24(2): 288-297.
- Kennedy PG, Bruns TD. 2005. Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two Rhizopogon species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytol* 166(2): 631-8.
- Kibar B, Peksen A. 2011. Nutritional and environmental requirements for vegetative growth of edible ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma terreum*. *Zemdirbyste-Agriculture* 98(4): 409-414.
- Kile GA. 1991. Armillaria root disease. Agriculture Handbook N°691. Forest service, United States Department of Agriculture, Washintong DV. 233pp.
- Krøyer R. 2006. Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiol Ecol* 58: 214-224.
- Lacal G. 2000. Estudios básicos para el control de *Sphaerosporella brunnea* (A. and S. ex Fr.) en los viveros de producción de encina (*Quercus ilex* L.) micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). Proyecto Fin de Carrera Escuela Politécnica de Huesca (UZ).
- Lahoz B. 2015. Determinación de la superficie cultiva de trufa negra y validación de un mapa de aptitud trufera en la provincia de Teruel. Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Zaragoza.
- Lamichhane JR, Varvaro L. 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. *Plant Pathol* 63: 243-54.
- Landvik S, Egger KN, Schumacher T. 1997. Towards a subordinal classification of the Pezizales (Ascomycota): phylogenetic analyses of SSU rDNA sequences. *Nord J Bot* 17: 403-418. Copenhagen. ISSN 0107-055X.
- Lanza B, Oweczarek M, De Marco A, Raglione M. 2004. Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of substances produced by *Tuber aestivum* and distributed in the soil using *Vicia faba* root micronucleus test. *Fresen Environ Bull* 13: 1410-1414.
- Larsen H. 1980. Key to the genera of the operculate cup-fungi (Pezizales) of the Pacific Northwest and Rocky Mountain Region. Pacific Northwest Key Council.
- Laviña A, Sabaté J, García-Chapa M, Batlle A, Torres E. 2004. Occurrence and epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in Spain. *Acta Horticult* 657: 489-494.
- Laviña A, Sabaté J, Batlle A. 2011. "Candidatus Phytoplasmas mali": identification of potencial insecto vectors in Apanish apple orchards. Second International Phytoplasma Working Group Meeting. Neustadt an der Weinstrasse, Germany. September 12-15.
- Le Tacon F, Delmas J, Gleyze R, Bouchard D. 1982. Influence du régime hydrique du sol et de la fertilisation sur la frutification de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.) dans le sud-est de la France. *Acta Oecologica. Oecologia Appl* 3: 291-306.
- Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Bréchet C, Robin C. 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *PloS one* 8(5): e64626.

- Le Tacon F, Rubini, A., Murat, C *et al.* 2016. Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Ann For Sci* 73: 105-117.
- Leal WS. 2013. Odorant recedption in insects: Role of receptors, binding proteins and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol* 58: 373-391.
- Learmonth S, Linde C, Mitchell A, Davey A, Mathews A, Seago A, Collie H. 2019. Pests and diseases of truffles and their host trees in Australia. *AgriFutures Australia Publication No. 19-040*.
- Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: Phylogenetic Mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54: 221-255.
- Lenne M. 2004. *Pulvinula convexella* (P.Karst.) Pfister. *Miscellanea Mycol* 80-81: 36-44.
- Letizi HC, Marchetti A, Rinaldini E. 2001. Il Contributo della "Assoziacione Nazionale conduttori tartufoie" (ACT) di Acqualagna (PS) allo sviluppo della tartuficoltura. En: *Actes du V Congrès International Science et Culture de la Truffe*. Aix en Provence: Fédération Française des Trufficulteurs, pp 345-349.
- Liebhold AM, Gottschalk KW, Muzika RM, Montgomery ME, Young R, O'Day K, Kelley B. 1995. Suitability of North American tree species to the gypsy moth: a summary of field and laboratory test. *USDA Forest Service General Technical Report NE-211*, 34pp.
- Lim PO, Sears BB. 1992. Evolutionary relationship of plant-pathogenic mucoplasmalike organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J Bacteriol* 174: 2606-2611.
- Lindley J (Ed). *The Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette*. 1845. London: Published for the Proprietors. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/101659#page/1/mode/1up>.
- Lloyd G, McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 30: 421-427.
- Lounibos LP, Escher RL. 2008. Sex ratios od mosquitoes from long-term censuses of Florida tree holes. *J Am Mosqu Control Assoc* 24(1): 11-15.
- Lozano-García S, Rodríguez-Guerra C. 2015. Operaciones culturales, riego y fertilización. Editorial Elearning 324pp.
- Lukić I, Schafellner C, Lakatos F, Lacković N, Mrmić S, Pernek M. 2017. Foliage maturity of *Quercus ilex* affects the larval development of a Croatian coastal population of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae). *Open Life Sci* 12: 12-18.
- Mabru D, Dupré C, Douet JP, Leroy P, Ravel C, Ricard JM, Medina B, Castroviejo M, Chevalier G. 2001. Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11: 89-94.
- Malumphy CP. 2008. First british outbreak of *Kermes vermilio* Planchon (Hemiptera: Kermesidae), a mediterranean pest of evergreen oaks. *Brit J Entomol Nat Hist* 21: 75-79.
- Manion PD. 1991. *Tree disease concepts* (2ª Edición) Ed. Prentice-Halls, Londres. 416 pp.

- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2018. RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGRARIA. Autorización del producto BLINDAR. <https://www.mapa.gob.es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/pdf/25924.pdf>
- Marco P. 2015. Caracterización bromatológica y microbiológica del g^o *tuber* y aplicación de procesos combinados para su conservación. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Marcone C, Ragozzino A, Cousin MT, Berges R, Seemüller E. 1999. Phytoplasma diseases of trees and shrubs of urban areas in Europe. En: Acta Horticulturae (496) Leuven: International Society for Horticultural Science (ISHS) pp: 69-75.
- Marozzi G, Sánchez S, Benucci GMN, Bonito G, Falini LB, Albertini E, Donnini D. 2017. Mycorrhization of pecan (*Carya illinoensis*) with black truffles: *Tuber melanosporum* and *Tuber brumale*. Mycorrhiza 27(3): 303-309.
- Marozzi G, Benucci GMN, Baciarelli-Falini L, Albertini E, Donnini D. 2018. Synthesis of *Tuber mesentericum* ectomycorrhizae with *Quercus pubescens*: a morphological review and DNA characterization. Sydowia 70: 81-88.
- Martín J, Cabezas J, Buyolo T, Patón D. 2005. The relationship between *Cerambyx* spp. damage and subsequent *Biscogniauxia mediterraneum* infection on *Quercus suber* forests. For Ecol Manage 216: 166-174.
- Martin F, Kohler A, Murat C. *et al.* 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. Nature 464: 1033-1038.
- Martín-Bernal E, Hernández-Alonso R, Ibarra N, Pérez-Forteza V, Cañada JF. 2002. Cochinillas de las encinas. *Kermes vermilio* Planch. Hemíptero. Fam. Kermesidae. En: La sanidad forestal en Aragón.: 20 años de informaciones técnicas: 1985-2005. Gobierno de Aragón. Departamento de Medio Ambiente. pp 157-160.
- Martín-Santafé M, Pérez-Forteza V, Zuriaga P, Barriuso J. 2014a. Phytosanitary problems detected in truffle cultivation. For Syst 23(2): 307-316.
- Martín-Santafé M, Sánchez S, Batlle A, Laviña A, Barriuso J. 2014b. First identification of the pathogen causing tumor malformations in holm oaks in Spain. For Syst 23(2): 357-363.
- Massini R, Landucci A. 1988. Trattamento e commercializzazione dei tartufi freschi e in conserva. Problemi normativi e sviluppo tecnologico. En: 2^o Congresso Internazionale sul Tartufu, Spoleto, Italia, 645e651.
- Mc Ewan RW, Rieske LK, Arthur MA. 2009. Potential interactions between invasive Woody shrubs and the gypsy moth (*Lymantria dispar*), an invasive insect herbivore. Biol Invasions 11: 1053-1058.
- McGuire KL. 2007. Common ectomycorrhizal networks may maintain monodominance in a tropical rain forest. Ecology 88(3): 567-74.
- Medardi G. 2001. Studio su alcune specie italiane del genere *Pulvinula*. Bollettino Circolo micologico G. Carini 42: 30-37.
- Melgarejo P, García-Jiménez J, Jordá MC, López MM, Andrés MF, Durán-Vila N (Coord.). 2010. Patógenos de plantas descritos en España (2^a Ed.) Ed. M^o Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 854pp.

- Mena J. 2001. Importancia de la biología térmica en la configuración de las comunidades de coleópteros coprófagos en ecosistemas mediterráneos (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae). Tesis Doctoral. Publicaciones Universidad de Alicante. 763 pp.
- Mencarelli F, Massantini R, Botondi R. 1997. Physiological and textural response of truffles during low-temperature storage. *J Hort Sci* 72(3): 407-14.
- Mendizábal M. 1937. Notas para un estudio de las especies españolas del género *Vesperus* (Col. Cerambycidae). Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Instituto de Investigaciones Agronómicas; sección de Fitopatología pp. 1-22.
- Meotto F, Carraturo P. 1988. Ectomicorrizia di *Sphaerosporella brunnea* (A. & S.) Svrcek & Kubicka in piantine tartufigene. *Allionia* 28: 109-116.
- Meotto F, Carraturo P, Dana M. 1992. Valutazione in pieno campo e in serra della competitività di *Sphaerosporella brunnea* con *Tuber magnatum*. *L' Informatore Agrario* 48: 73-78.
- Meyer J. 1987. Plant galls and gall inducters. Gebrüder Bontraeger, Berlin, Stuttgart. 291pp.
- Michaels JM. 1982. In vitro culture and growth modeling of *Tuber* spp. and inoculation of hardwoods with *T. melanosporum* ascospores. Oregon State University. 115 pp.
- Michel JC. 2010. The physical properties of peat: a key factor for modern growing media. *Mires Peat* 6 (2): 1-6.
- Miller SL. 1985. Rodent pellets as ectomycorrhizal inoculum for two *Tuber* spp. En *Proceedings of the VI North American Conference on Mycorrhizae*, R. Molina (ed.). Oregon State University, Forest Research Laboratory, Corvallis, Oregon. 273 p.
- Miller M, Mcgonigle T, Addy H. 1994. An economic approach to evaluate the role of mycorrhizas in managed ecosystems. *Plant soil* 159: 27-35.
- Mollá S, Villar P, Peñuelas JL, García-Fayos P. 2003. Influencia de la localización del vivero sobre la resistencia a la helada y el desarrollo en campo de *Quercus ilex* spp. *Montes* 74: 23-30.
- Molnar TJ, Goffreda JC, Funk R. 2010. Survey of *Corylus* Resistance to *Anisogramma anomala* from Different Geographic Locations. *HortScience*. 45(5): 832-836.
- Montoya JM. 1988. Los alcornocales. Min. Agri.,Pes. y Alim. Madrid. 251 pp.
- Moorhousea ER, Charnleya K, Gillespie T. 2008. A review of the biology and control of the vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann Appl Biol* 121(2): 431- 454.
- Moralejo E, García-Muñoz JA, Descals E. 2009. Susceptibility of Iberian trees of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol* 58(2): 2071-283.
- Moran VC, Gunn BH, Walter GH. 1982. Wind dispersal and settling of first-instar crawlers of the cochineal insect *Dactylopius austrinus* (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Ecol Entomol* 7: 409-419.
- Morcillo M, Sánchez M, Vilanova X. 2015. Cultivar trufas. Una realidad en expansión. Ed. Micología forestal y aplicada. Barcelona, España. 349pp.
- Morrison DJ. 1976. Vertical distribution of *Armillaria mellea* rhizomorphs in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 66 (3): 393-399.
- Moser M. 1960. Die Gattung Phlegmacium. *Die Pilze Mitteleuropas* 4. J. Bad Heilbrunn. 440 p.

- Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML. 2008. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. For Pathol 38: 275-287.
- Muñoz MC, Rupérez A. 1987. La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. Bol San Veg Plagas 13: 203-212.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.
- Murat C, Bonneau L, De la Varga H, Olivier JM, Sandrine F, Le Tacon F. 2016. Trapping truffle production in holes: a promising technique for improving production and unravelling truffle life cycle. It Jour Mycol 45(1): 47-53.
- Navarro-Llopis V, López B, Vacas S, Primo J, Martín-Santafé M. 2019. El trampeo masivo como método de control de *Leiodes cinnamomeus* en el cultivo de la trufa negra *Tuber melanosporum*. Comunicación oral. XI Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Madrid. Noviembre 2019.
- Navarro-Llopis V, López B, Primo J, Martín-Santafé M, Vacas S. 2020. Control of *Leiodes cinnamomeus* (Coleoptera: Leiodidae) in cultivated black truffle orchards by kairomone-based mass trapping. J Economic Entomol. DOI: 10.1093/jee/toaa317.
- Necas T, Krska B. 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. Acta Horticulturae 717: 101-105.
- Newton AF. 1984. Mycophagy in Staphylinoidea (Coleoptera). Fungus-Insects relationships. Perspectives in Ecology and Evolution (ed. By Q Wheeler and M Blackwell). Columbia University Press, New York. Pp 302-353.
- Newton AF. 1998. Phylogenetic problems, current classification and generic catalogue of world Leiodidae (including Cholevidae). En: Giachino PM, Peck SB (eds.): Phylogeny and Evolution of Subterranean and Endogean Cholevidae (=Leiodidae Cholevinae). Proceedings of a Symposium (30 August, 1996, Florence, Italy), XX International Congress of Entomology. Atti del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, 41-178.
- Nieves-Aldrey JL. 1998. Insectos que inducen la formación de agallas en las plantas: una fascinante interacción ecológica y evolutiva. Boletín sociedad entomología aragonesa. CSIC 23: 3-12.
- Nisimura T, Numata H, Yoshioka E. 2005. Effect of temperature on circadian rhythm controlling the crepuscular activity of the burying beetle *Nicrophorus quadripunctatus* Kraatz (Coleoptera: Silphidae). Entomol Science 8: 331-338.
- Núñez-Vázquez L. 2007. Gran capricornio (*Cerambyx cerdo* Linnaeus spp. *mirbeckii* Lucas). El insecto perforador de los troncos de encina. <http://sanitatforestal.caib.es>.
- Oliach, D, Morte, A, Sánchez, S, Navarro-Ródenas, A, Marco, P, Gutiérrez, A, Martín-Santafé, M, Fischer, C, Albisu, L M, García-Barreda, S, Martínez-Peña, F, Colinas, C. 2020. Las trufas y las turmas. En: Sánchez-González, M, Calama, R, Bonet, J A (Eds.), Los productos forestales no madereros en España: Del monte a la industria. Monografías INIA: Serie Forestal, 31, Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España, Madrid.

- Oliver JM, Sauvignac JC, Sourzat P. 1996. Truffe et trufficulture. Ed. Fanlac, Périgueux, France. 263pp.
- Olivier JM, Sauvignac JC, Sourzat P. 2012. Truffe et trufficulture (3). Ed. Fanlac, Périgueux, France. 397pp.
- Olivera A, Bonet JA, Oliach D, Colinas C. 2014. Time and dose of irrigation impact *Tuber melanosporum* ectomycorrhiza proliferation and growth of *Quercus ilex* seedling hosts in young black truffle orchards. *Mycorrhiza* 24(1): 73-78.
- Olmi M. 1975. Nemici della vite. Eccezionali danni provocati in Piemonte dal Coleottero Cerambycidae *Vesperus strepens* F. *L'Italia Agricola* 112 (9): 105-111.
- Ortiz A, Pérez-Andueza G, Saucedo C, Herrero F. 2014. Electrophysiological (EAG) responses of *Leiodes cinnamomeus* to volatiles isolated from *Tuber melanosporum*. 1st International Conference on Truffle Research '14. Vic. Barcelona.
- Pacioni G. 1989. Biology and ecology of the truffles. *Acta Medica Romana* 27: 104-117.
- Pacioni G, Lalli G. 1990. Strategie adattative di alcuni *Tuber*. *Atti Del Secondo Congresso Internazionale Sul Trufufo*, Spoleto, Italia: 403-408.
- Pacioni G, Bologna MA, Laurenzi M. 1991. Insect attraction by *Tuber*: a chemical explanation. *Mycol Res* 95(12): 1359-1363.
- Pacioni G. 1991. Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycol Res* 95: 1355-1358.
- Pagliari L, Musetti R. 2019. Phytoplasmas: An Introduction. En: Musetti R., Pagliari L. (eds) *Phytoplasmas. Methods in Molecular Biology*, vol 1875. Humana Press, New York, NY.
- Palazón C, Delgado I, Cartié G, Barriuso J, Esteban H. 1999a. Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* spp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vittad., para la obtención, en España, de la etiqueta de certificación. 5^o Congreso International Science et Culture de la Truffe, Aix-en-Provence, pp 6.311-6.313.
- Palazón C, Delgado IC, Barriuso J. 1999b. Estudio de la influencia de seis factores a tres niveles, sobre el proceso de micorrización de *Quercus ilex* por *Tuber melanosporum* y sobre la mortalidad producida en el mismo. 5^o Congreso International Science et la Culture de la Truffe. Aix en Provence. France.
- Palazón C, Barriuso J, Delgado I. 2005. Lucha química contra el contaminante *Sphaerospora brunnea* (A. & S. ex Fr.) Svrcek & Kubicka, responsable de la "micorriza marrón" de los invernaderos de producción de planta micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). En: Sociedad Española de Ciencias Forestales ed. IV Congreso Forestal Español.
- Palazón C, Barriuso J. 2012. Viveros y producción de planta micorrizada. En: *Truficultura. Fundamentos y técnicas* (2^a Edición). S. Reyna (Ed.). Mundi prensa. 720 pp.
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S. 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol Ecol* 28: 23-30.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S. 2006. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Appl Environ Microbiol* 72: 2390-2393.

- Peck SB, Gnaspini P, Newton AF. 2020. Updated catalog and generic keys of the Leiodidae (Insecta: Coleoptera) of the Neotropical region ("Latin America": Mexico, the West Indies, and Central and South America). *Zootaxa* 4741 (1): 1-114.
- Peñuelas, J. 1993. Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas. *Montes* 33: 84-97.
- Peñuelas, J. 1995. Calidad de la planta forestal: normativa y control. Jornadas sobre nuevas técnicas de producción de planta forestal. Junta de Castilla y León. Molinos de Duero, Soria. 7-10 de octubre de 1995.
- Pérez de Obanos JJ. 1994. Gusanos blancos y de alambre (*Melolontha* sp. y *Anoxia villosa* L. *Agriotes* sp.). Publicaciones del Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación.
- Pérez-Andueza G. 2015a. Entomofauna asociada a la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittadini) cultivada en España Central: incidencia y valoración de las principales especies micófagas (Coleoptera, Leiodidae; Diptera, Heleomyzidae). Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Facultad de biología. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Diciembre de 2015.
- Pérez-Andueza G. 2015b. Insectos micófagos (leiódidos y heleomícidos) asociados a la trufa negra en España Central. Presentación. II Curso de truficultura práctica. Universidad de Verano de Teruel (Fundación Antonio Gargallo). Mora de Rubielos.
- Pérez-Fortea V, Martín-Santafé M (Coord.). 2018. La sanidad en truficultura. Guía de identificación de agentes nocivos en truficultura. Ed. Gobierno de Aragón. 156 pp.
- Perez-Izquierdo L, Pulido F. 2013. Spatiotemporal variation in acorn production and damage in a Spanish holm oak (*Quercus ilex*) dehesa. *Forest Syst* 22(1): 106-113.
- Pérez-Moreno, I. 1997. Principales métodos biotécnicos empleados en el control de plagas. *Bol. S.E.A.*, 20: 127-140.
- Perreau M. 2004. Family Leiodidae (pp. 133-203): En LÖBL, I. & A. SMETANA (editors): *Catalogue of Palearctic Coleoptera*. Vol. 2. Apollo Books. Stenstrup. 942 pp.
- Perreau M. 2006. Errata for Volume 2. En: I. Löbl, I. & A. Smetana (eds.). *Catalogue of Palearctic Coleoptera*. Vol. 3. Apollo Books. Stenstrup: 23.
- Petersen PM. 1985. The ecology of Danish soil inhabiting Pezizales with emphasis on edaphic conditions. *Oper Bot* 77: 1-38.
- Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. CABI Publishing. Wallingford. 196 pp.
- Pfister DH. 1976. A Synopsis of the genus *Pulvinula*. *Occasional papers of the Farlow Herbarium of cryptogamic botany* 9: 1-19.
- Pradel L. 1914. *Manuel de Trufficulture*. JB Baillièrre El fils, Paris. 156 pp.
- Pratt PD, Rayamajhi MB, Van TK, Center TD. 2004. Modeling the Influence of Resource Availability on Population Densities of *Oxyops vitiosa* (Coleoptera: Curculionidae), a Biological Control Agent of the Invasive Tree *Melaleuca quinquenervia*. *Biocontrol Sci Technol* 4(1): 51-62.

- Prezelj N, Nikolić P, Gruden K, Ravnihar M, Dermastia M. 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathol* 62: 760-766.
- Pujade-Villar J, Ros-Farré P. 1998. Inquilinos y parasitoides de las agallas del género *Plagiotrochus* Mayr colectadas en el Nordeste de la Península Ibérica. *Boln Asoc Esp Ent* 22 (1-2): 115-143.
- Queralt M, Moraza ML, De Miguel AM. 2014. Preliminary study of the mite community structure in different black truffle producing soils. *For Syst* 23(2): 339-348.
- Queralt M, Parladé J, Pera J, De Miguel AM. 2017. Seasonal dynamics of extraradical mycelium and mycorrhizas in a black truffle (*Tuber melanosporum*) plantation. *Mycorrhiza* 27: 565-576.
- Quintana A. 2007. Establecimiento y rentabilidad de una plantación trufera. *Sustrai. Rev agropesquera* 81: 56-58.
- Rai M, Varma A. 2011. Diversity biotechnology of ectomycorrhizae. Springer, Berlin, 458 pp.
- Rauscher T, Agerer R, Chevalier G. 1995. Ektomycorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) and *Corylus avellana* L. *Nova Hedwigia* 61: 281-322.
- Read D. 1997. Mycorrhizal fungi. The ties that bind. *Nature* 388(6642): 517-8.
- Regassa LB, Gasparich GE. 2006. Spiroplasma: Evolutionary relationship and biodiversity. *Front Biosci* 11: 2983-3002.
- Reyna S. 1999. Aproximación a una selvicultura trufera. Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Universidad Politécnica de Madrid.
- Reyna S, Boronat T, Palomar E. 2000. Control de calidad en la planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. producida por viveros comerciales. *Montes* 61: 17-24.
- Reyna S, Folch L, Alloza JA. 2002. La truficultura: una dehesa rentable para los encinares en suelos calizos. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 14: 95-102.
- Reyna S, García S, Folch L, Pérez-Badía R, Galiana F, Rodríguez-Barreal JA, Domínguez-Núñez JA, Sáiz de Omeñaca JA, Zazo J. 2004. Selvicultura trufera eb montes mediterráneos. En: Vallejo R y Alloza JA (eds). *Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo*. Fundación CEAM. Valencia. pp 523-546.
- Reyna S, Gacia-Barreda S, Folch L. 2006. Influencia del uso del suelo sobre el potencial de inóculo ectomicorrícico y a competitividad de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum*: evaluación mediante bioensayos en invernadero. *Inv Agrar: Sist Rec Forest* 15(3): 308-320.
- Reyna S, De Miguel AM. 2007. Las micorrizas. Ciclo biológico de la trufa. En: *Truficultura. Fundamentos y técnicas*. S. Reyna (Coord.). Mundi prensa. pp 107-152.
- Reyna S. 2012. *Truficultura. Fundamentos y técnicas*. Ed Mundi-Prensa. Madrid, 720 pp.
- Reyna S, Colinas C. 2012. Truficultura. En *Truficultura: Fundamentos y técnicas* (coord. Reyna S.) Ed. Mundi-Prensa pp 235-274.
- Reyna S, García-Barreda S. 2014. Black truffle cultivation: a global reality. *For Syst* 23(2): 317-328.

- Ribak G, Mordechay O, Weihs D. 2013. Why are there no long distance jumpers among click-beetles (Elateridae)? *Bioinspir Biomim* 8(3): 036004.
- Ricard JM. 2003. La truffe. Guide technique de trufficulture. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes CTIFL, Paris. 268pp.
- Riley MB, Williamson MR, Maloy O. 2002. Plant disease diagnosis. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1021-01
- Rivera CS. 2009. Caracterización, descontaminación y conservación de *Tuber melanosporum* (trufa negra) y *Tuber aestivum* (trufa de verano). Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Rivera CS, Blanco C, Oria R, Venturini ME. 2010a. Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiol* 27: 286-293.
- Rivera CS, Blanco D, Salvador ML, Venturini ME. 2010b. Shelf-life extension of fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles by modified atmosphere packaging with microperforated films. *J Food Sci* 75(4):E225-E233.
- Rivera CS, Venturini ME, Oria R, Blanco D. 2011a. Selection of a decontamination treatment for fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles packaged in modified atmospheres. *Food Control* 22: 626-632.
- Rivera CS, Venturini ME, Marco P, Oria R, Blanco D. 2011b. Effects of electron beam and gamma irradiation treatments on the microbial populations, respiratory activity and sensory characteristics of *Tuber melanosporum* truffles packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol* 28 (2011): 1252-1260.
- Rodríguez JA, Sáiz JA, Zazo J. 1989. Efectos positivos de la micorrización controlada con el hongo *Tuber melanosporum* Vitt. de la especie forestal *Corylus avellana* L. obtenido mediante reproducción vegetativa. *Bol Veg Plagas* 15: 207-214. Madrid.
- Romeo R. 2014. Biología y control de la cochinilla de las encinas (*Kermes ilicis* y *Kermes vermilio*) en truficultura. Proyecto fin de Carrera. Universidad de Zaragoza. Escuela Politécnica Superior de Huesca.
- Rozhkov A., Khlimankova ES, Stepanchuk ES. 1991. Restoration processes in conifers during defoliation. Novosibirsk, Nauka, 86 p.
- Rubini A, Belfiori B, Passeri V, Baciarelli Falini L, Arcioni S, Riccioni C, Paolocci F. 2011a. The AD-type ectomycorrhizas, one of the most common morphotypes present in truffle fields, result from fungi belonging to the *Trichophaea woolhopeia* species complex. *Mycorrhiza* 21(1): 17-25.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011b. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *The New Phytologist* 189: 710-22.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011c. *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytol* 189: 723-735.

- Ruiz-Babarin JI, Saucedo-Berguio C, Pérez-Andueza G. 2010. Trampa para la captura de insectos ES1071222 (U)-2010-02-05. Priority number 430 ES20090030547U 20091020.
- Sabate J, Rodon J, Artigues M, Lavina A, Batlle A. 2018. Transmission of 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' by naturally infected *Cacopsylla pyri* to peach, an approach to the epidemiology of peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain. *Plant Pathol* 67(4): 978-987.
- Sáez R. De Miguel AM. 2008. La trufa: guía de truficultura. Ed. Instituto Técnico y de Gestión Agrícola, S.A. Navarra. 132 pp.
- Sáez-Bolaño JA, Blanco-Villero LM, Fresneda J. 2012. Descripción de una nueva especie del género *Leiodes* Latreille, 1797 de la península ibérica (Coleoptera, Leiodidae, Leiodinae). *Graellsia* 68(2): 281-290.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a Laboratory 125 manual* (2ª ed.) Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samils N, Olivera A, Danell E, Alexander SJ, Colinas C. 2003. Aportación de la truficultura al desarrollo socioeconómico. *Vida rural* 181: 54-60.
- Samils N, Olivera A, Danell E, Alexander SJ, Fischer C, Colinas C. 2008. The Socioeconomic Impact of Truffle Cultivation in Rural Spain. *Econ Bot* 62(3): 331-340.
- Sánchez F, Honrubia M, Torres P. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Rev Iberoam Micol* 17: 127-134.
- Sánchez ME, Caetano P, Ferraz J, Trapero A. 2002. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in South-western Spain. *Forest Pathol* 32 (1): 5-18.
- Sánchez S. 2012. Ectomicorrizas en el cultivo de trufa negra: ecología, diversidad y gestión. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Sánchez S, Gómez E, Martín-Santafé M, De Miguel AM, Urban A, Barriuso JJ. 2014a. Experiments on the life cycle and factors affecting reproduction of *Sphaerospora brunnea* provide evidence for rapid asexual propagation by conidiospores and for homothallism in an ectomycorrhizal competitor of cultivated truffle species. *Fungal Ecol* 8: 59-65.
- Sánchez S, Ágreda T, Águeda B, Martín-Santafé M, De Miguel AM, Barriuso JJ. 2014b. Persistence and detection of black truffle ectomycorrhizas in plantations: comparison between two field detection methods. *Mycorrhiza* 24(Suppl 1): 39-46.
- Sato H, Tanabe AS, Toju H. 2015. Contrasting Diversity and Host Association of Ectomycorrhizal Basidiomycetes versus Root-Associated Ascomycetes in a Dipterocarp Rainforest. *PLoS ONE* 10(4): e0125550.
- Schneider B, Marcone C, Kampmann M, Ragozzino A, Lederer W, Cousin MT, Seemüller E. 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103: 675-686.
- Schneider-Maunoury L, Taschen E, Richard F, Selosse MA. 2019. Soil spore bank in *Tuber melanosporum*: up to 42% of fruit bodies remain unremoved in managed truffle grounds. *Mycorrhiza* 29(6): 663-668.
- Schultz JC, Lechowicz MJ. 1986. Host plant, larval age and feeding behaviour influence midgut pH in the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Oecologia* 71: 133-137.

- Scortichini M, Ferrante P, Cozzolino L, Zoina A. 2016. Emended description of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*, causal agent of European hazelnut (*Corylus avellana* L.) bacterial canker and decline. *Eur J Plant Pathol* 144: 213-215.
- Seemüller E, Schaper U, Zimbelmann F. 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *J Plant Dis Prot* 91: 371-382.
- Seemüller E, Schneider B. 2004. "*Candidatus* Phytoplasma *mali*", "*Candidatus* Phytoplasma *piri*", and "*Candidatus* Phytoplasma *prunorum*", the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int J Syst Evol Micr* 54: 1217-1226.
- Serrano-Notivoli R, Incausa A, Martín-Santafé M, Sánchez-Durán S, Barriuso JJ. 2015a. Modelización espacial del hábitat potencial de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en la provincia de Huesca (España). *ITEA* 111(3): 227-246.
- Serrano-Notivoli R, Martín-Santafé M, Sánchez-Durán S, Barriuso JJ. 2015b. Cultivation potentiality of black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) in Zaragoza province (Northeast Spain). *J Maps* 12(5): 994-998.
- Shamseldean MM, Hasanain SA, Rezk MZA. 2009. Virulence of entomopathogenic nematodes against lepidopterous pests of horticultural crops in Egypt. *Proceedings of the 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture "Challenges of Agriculture Modernization"* Vol. 1, pp. 74-84.
- Shorthouse JD, Rohfritsch O (eds). 1992. *Biology of Insect-induced galls*. Oxford University Press, New York, Oxford, 285pp.
- Simard SW, Durall DM. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian J Bot* 82(8): 1140-65.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E, Kirkpatrick B. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl Environ Microbiol* 62: 2988-2993.
- Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol* 174: 847-863.
- Smith S, Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (3ª edición). Academic press, San Diego. 800pp.
- Solís K. 2017. Efectos de rhizoctonia spp. Binucleada y trichoderma harzianum rifai sobre la micorriza de *Tuber melanosporum* vittad. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Soria FJ, Cano E, Ocete ME. 1996. Efectos del ataque de fitófagos perforadores en el fruto de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.) *Bol San Veg Plagas* 22: 427-432.
- Soria S, López MM, Lopez-Lopez MJ. 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la "seca de la encina". *Ecología* 11: 295-301.
- Soria S, Notario A. 1990. *Tortrix viridana* L. (Lepidóptero Tortricidae) una plaga de las encinas de problemático control. *Bol San Veg Plagas* 16: 247-262.

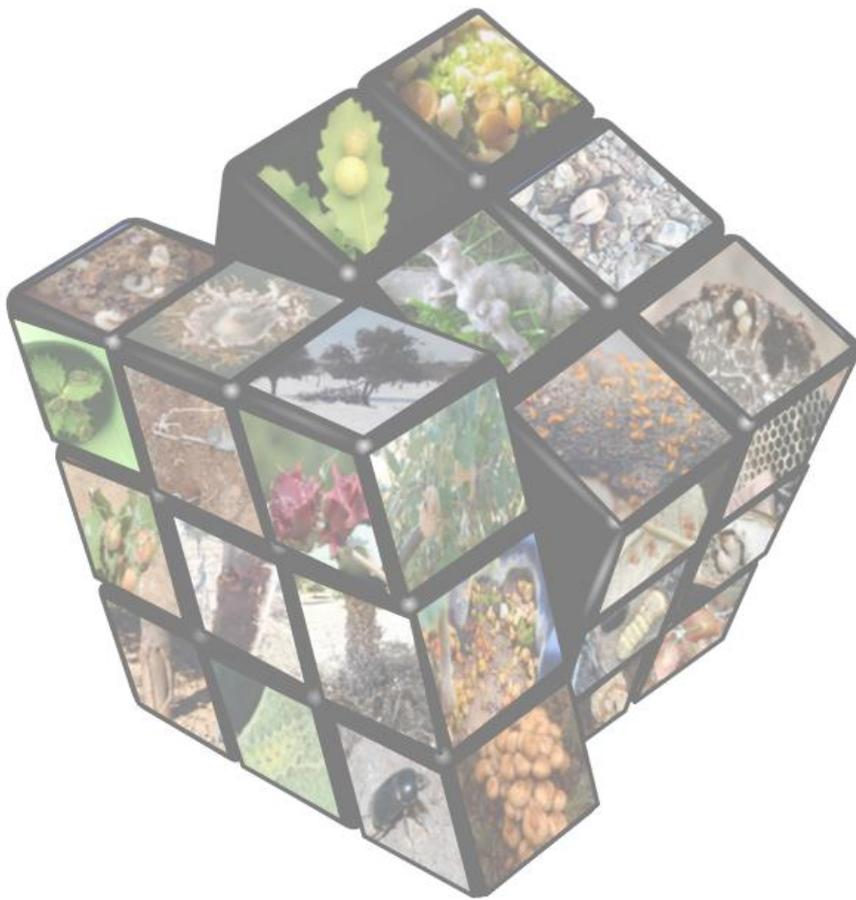
- Soria Carreras S, Soria Ruiz-Ogarrio S. 2018. Determinación del estado sanitario de las plantas, suelo e instalaciones y elección de los métodos de control. Ed. Paraninfo. 158pp.
- Spodek M, Ben-Dov Y. 2012. Morphology of the first-instar nymph and adult female of *Kermes echinatus* Balachowsky, with a comparison to *K. vermilio* Planchon (Hemiptera, Coccoidea, Kermesidae). ZooKeys 246: 11-26.
- Staudt M., Lhoutellier L. 2007. Volatile organic compound emission from holm oak infested by gypsy moth larvae: evidence for distinct responses in damaged and undamaged leaves. Tree Physiol 27: 1433-1440.
- Sullivan PR, Hosking JR. 1995. Colonisation of a stand of smooth tree pear, *Opuntia vulgaris* (Cactaceae), by *Dactylopius ceylonicus* (Hemiptera: Dactylopiidae) on the north coast of New South Wales, Australia. Proceedings of the Eighth International Symposium on Biological Control of Weeds 2-7 February 1992, Lincoln University, Canterbury, New Zealand. Delfosse, E. S and R.R Scott (eds). DSIR/CSIRO, Melbourne, pp 227-30.
- Talou T, Gaset A, Delmas M, Kulifaj M, Montant C. 1990. Dimethyl sulphide: the secret for black truffle hunting by animals? Mycol Res 94: 277-278.
- Tanno K, Maejima K, Miyazaki A, Koinuma H, Iwabuchi N, Kitazawa Y, Nijo T, Hashimoto M, Yamaji Y, Namba S. 2018. Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma diseases using an in vitro plant-phytoplasma co-culture system. Microbiology 164 (8): 1048-1058.
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjølner R. 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. New Phytol 170: 581-596.
- Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I, et al. 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon specific primers. New Phytol 180(2): 479-90.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza 20(4): 217-63.
- Thongklang N, Hyde KD, Bussaban B, Lumyong S. 2010. Culture condition, inoculum production and host response of a wild mushroom, *Phlebopus portentosus* strain CMUHH121-005. Maejo Int J Sci Technol 5(03): 413-425.
- Tobin PC, Liebhold AM. 2011. Gypsy moth. En D Simberloff, M Rejmanek (Eds.). Encyclopedia of Biological Invasions (pp. 298-304). Berkeley: University of California Press.
- Tocco C, Dacke M, Byrne M. 2019. Eye and wing structure closely reflects the visual ecology of dung beetles. J Comp Physiol 205: 211-221.
- Torrecilla P, Catalán P. 2002. Phylogeny of broad-leaved and fine-leave *Festuca lineages* (Poaceae) based on molecular ITS sequences. Syst Bot 27: 241-251.
- Torres-Vila LM, Cruces E, Sánchez, A, Ferrero JJ, Ponce F, Martín D, Aza C, Rodríguez F, Barrena F. 2008. Dinámica poblacional y daños de *Curculio elephas* Gyllenhal (Col.: Curculionidae), *Cydia fagiglandana* Zeller, *Cydia triangulilla* Goeze y *Pammene fasciana* L. (Lep.: Tortricidae) sobre *Quercus* y *Castanea* en Extremadura. Bol San Veg Plagas 34: 329-341.
- Townes H. 1972. A light weight malaise trap. Entomol News 83: 239-247.

- Tran-Nguyen L, Blanche K, Egan B, Gibb K. 2000. Diversity of phytoplasmas in northern Australian sugarcane and other grasses. *Plant Pathol* 49: 666-679.
- Trapero A, Blanco MA. 2004. Enfermedades. En: Barranco D, Fernández R, Rallo L (eds). El cultivo del olivo 5ª Edición, Junta de Andalucía. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 557-614.
- Trapero A, Viruega JR, López-Doncel LM, Segura R, Alsalimiya M, Moral J, Roca LF. 2010. Repilo del olivo. En: Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado. *Phytoma* 267-296.
- Trappe JM, Molina R, Castellano M. 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formatio to pesticides. *Ann Rev Phytopathol* 22: 331-359.
- Trocha LK, Rudawska M, Leski T, Dabert M. 2006. Genetic Diversity of Naturally Established Ectomycorrhizal Fungi on Norway Spruce Seedlings under Nursery Conditions. *Microb Ecol* 52(3): 418-25.
- University of California, Agriculture & Natural Resources. 2013. UC-IPM (on line) <http://www.ipm.ucdavis.edu/>. Consultado el 4 de Febrero de 2019.
- Urbanová Z Urban J. 2016. *Attelabus nitens* (Scop.) An abundant but biologically little known species from the family of Attelabidae (Coleoptera). *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis* 64(5): 1675-1696.
- Vaario L, Gill W, Tanaka M, Ide Y, Suzuki K. 2000. Aseptic ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* and *Cenococcum geophilum* in artificial culture. *Mycoscience* 41: 395-399.
- Van Tol R, Visser JH. 2002. Olfactory antennal responses of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* to plant volatiles *Entomol Exp Appl* 102: 49-64.
- Van Tol R, Van Dijk N, Sabelis MW. 2004. Host plant preference and performance of the vine weevil *Otiorhynchus sulcatus*. *Agric For Entomol* 6(4): 267-278.
- Velázquez-Valle R, Reveles LR, Mauricio JA, Mena J, Amador MD, Salas S, Reveles M, Creamer R, Chew I, Chapa AM, Mejía L, González MM, Cid JA. 2014. Virus y fitoplasmas de Chile: Una perspectiva regional. Libro técnico No. 10. Campo experimental Zacatecas. CIRNOC, INIFAP, 279 pp.
- Verlhac A, Giraud M, Leteinturier J. 1990. La Truffe guide pratique. CTIFL, Paris.
- Visser JH. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 31: 121-144.
- Vives E. 2004. Révision du genre *Vesperus* Dejean 1821 (Coleoptera : Cerambycidae). *Annales-Societe Entomologique de France* 40 (3-4).
- Von Arx JA. 1987. Plant pathogenic fungi. J. Cramer, Berlin. 288pp.
- Wang B, Qiu YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(5): 299-363.
- Wang YJ, Tan ZM, Zhang DC, Murat C, Jeandroz S, Le Tacon F. 2006. Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycol Res* 110: 1034-1045.
- Webster J, Rifai MA, Sami El-Abyad M. 1964. *Trans Brit Mycol Soc* 47(3): 445-454.
- Weintraub P, Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51: 1- 111.

- Wenkart S, Roth-Bejerano N, Mills D, Kagan-Zur V. 2001. Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus*. Plant Cell Reports 20: 369-373.
- Wensler RJ. 1974. Crepuscular activity of adult *Sericesthis geminata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Influence of circadian rhythmicity and light intensity. N Z J of Zool 1(2): 197-204.
- Werno J, Lamy M. 1994. Daily cycles for emission of urticating hairs from the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* S.) and the brown tail moth (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Lepidoptera) in laboratory conditions. Aerobiologia (Bologna) 10: 147-151.
- Widmer TL, Tooley PW, Camp M.J. 2018. Recovery of *Phytophthora ramorum* in plant tissue with mixed infections. Eur J Plant Pathol 150: 253-258.
- Wilhelm E, Burg A, Berenyi M, Endemann M, Rodler R. 1996. Plantlet Regeneration Via Somatic Embryogenesis and Investigations on *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of Oak (*Quercus robur*). En: Ahuja M.R., Boerjan W., Neale D.B. (eds) Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees. For Scien vol 49.
- Wilson MR, Weintraub PG. 2007. An introduction to *Auchenorrhyncha* phytoplasma vectors. Bulletin of Insetology 60: 77-178.
- Wiman NG, Webber III JB, Wiseman M, Merlet L. 2019. Identity and pathogenicity of some fungi associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) trunk cankers in Oregon. PLoS ONE 14(10): e0223500.
- Wood SN. 2017. Generalized additive models: an introduction with R. Segunda Edición. Ed. Chapman and Hall/CRC. 496 pp.
- Wu B, Nara K, Hogetsu T. 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi in colonizing *Pinus densiflora*. Mycorrhiza 9: 151-159.
- Yao YJ, Spooner BM. 1996. Notes on British species of *Pulvinula*, with two newly recorded species. Mycol Res 100 (7): 883-884.
- Zambonelli A. 1993. Effect of treatments against *Quercus* powdery mildew on the formation of mycorrhiza of *Tuber albidum* and *Tuber aestivum*. Informatore Fitopatologico 43(2): 59-62.
- Zambonelli A, Salomoni S, Pisi A. 1993. Caratterizzazione anatomomorfologica delle micorrizze di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. Micol Ital 3: 73-90.
- Zambonelli A, Iotti M, Rossi I, Hall I. 2000. Interactions between *Tuber borchii* and other ectomycorrhizal fungi in a field plantation. Mycol Res 104(6): 698-702.
- Zambonelli A, Iotti M, Boutahir S, Lancellotti E, Perini C, Pacioni G. 2012. Ectomycorrhizal fungal communities of edible ectomycorrhizal mushrooms En: Zambonelli A, Bonito GM (eds). Edible ectomycorrhizal mushrooms, current knowledge and future prospects. Soil Biol 34: 105-124.
- Zeller B, Bréchet C, Maurice JP, Le Tacon F. 2008. Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on ¹³C and ¹⁵N natural abundance. Ann For Sci 65(6): 607.

- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2): 203-14.
- Zhang ZQ. 2011. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148: 7-12.
- Zhang ZQ. 2013. Phylum Arthropoda. En: *Animal Biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*, Zhang ZQ (eds). *Zootaxa* 3703: 17-26.
- Zobel B, Talbert J. 1988. *Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales*. Limusa. 545 pp.

ANEJOS



Planta 2013. *Quercus ilex* testigos de *Tuber melanosporum* y *Tuber aestivum*

TTO	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	MICORRIZACIÓN POR SECTORES			MEDIA
TESTIGOS	AMBAS	<i>Q. ilex</i>	SI	1	S1	143/62	43,36	43,72
					S2	145/62	42,76	
					S3	111/50	45,05	
				2	S1	157/24	15,29	26,77
					S2	142/53	37,32	
					S3	130/36	27,69	
				3	S1	135/43	31,85	39,92
					S2	159/61	38,36	
					S3	226/112	49,56	
				4	S1	149/82	55,03	44,26
					S2	162/60	37,03	
					S3	140/57	40,71	
				5	S1	153/56	36,60	23,83
					S2	113/20	17,70	
					S3	128/22	17,19	
TESTIGOS	AMBAS	<i>Q. ilex</i>	NO	1	S1	249/3	1,20	0,40
					S2	160/0	0	
					S3	0	0	
				2	S1	145/47	32,41	48,50
					S2	117/57	48,72	
					S3	101/65	64,36	
				3	S1	180/15	8,33	10,44
					S2	127/12	9,45	
					S3	170/23	13,53	
				4	S1	222/11	4,95	1,944
					S2	114/1	0,88	
					S3	115/0	0	
				5	S1	267/3	1,12	0,374
					S2	276/0	0	
					S3	207/0	0	

Planta 2013. *Quercus faginea* testigos de *T.r melanosporum* y *T. aestivum*

TTO	TRUFA	SIMBIONTE	CARPÓFOROS	PLANTA	MICORRIZACIÓN POR SECTORES			MEDIA
TESTIGOS	AMBAS	<i>Q. faginea</i>	SI	1	S1	276/20	7,25	14,71
					S2	134/11	8,21	
					S3	157/45	28,66	
				2	S1	183/62	33,88	21,72
					S2	201/53	26,37	
					S3	265/13	4,91	
				3	S1	271/4	1,48	1,69
					S2	195/7	3,59	
					S3	122/0	0	
				4	S1	141/34	24,11	40,48
					S2	109/54	49,54	
					S3	157/75	47,77	
				5	S1	144/59	40,97	25,97
					S2	146/22	15,07	
					S3	128/28	21,88	
TESTIGOS	AMBAS	<i>Q. faginea</i>	NO	1	S1	150/57	38	20,96
					S2	165/29	17,58	
					S3	164/12	7,32	
				2	S1	161/35	21,74	14,78
					S2	152/20	13,16	
					S3	127/12	9,45	
				3	S1	243/97	39,92	19,05
					S2	151/14	9,27	
					S3	138/11	7,97	
				4	S1	167/10	5,99	1,99
					S2	156/0	0	
					S3	155/0	0	
				5	S1	184/0	0	0
					S2	155/0	0	
					S3	190/0	0	

Planta 2013. *Q. ilex* inoculada con *T. aestivum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices		MICORRIZAS		MEDIA	
					Tuber	Pulvinula	Tuber	Planta		
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q. ilex</i>	Si	1	S1	NO HAY PLANTA INOCULADA CON TUBER AESTIVUM CON CARPÓFOROS DE PULVINULA				
					S2					
					S3					
				2	S1					
					S2					
					S3					
				3	S1					
					S2					
					S3					
				4	S1					
					S2					
					S3					
				5	S1					
					S2					
					S3					
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q. ilex</i>	No	1	S1	140	67	0	47,86	35,75
					S2	117	50	0	42,74	
					S3	114	19	0	16,67	
				2	S1	186	57	0	30,65	49,60
					S2	129	78	0	60,47	
					S3	104	60	0	57,69	
				3	S1	150	89	0	59,33	67,56
					S2	183	129	0	70,49	
					S3	129	94	0	72,87	
				4	S1	115	88	0	76,52	70,91
					S2	120	81	0	67,5	
					S3	115	79	0	68,7	
				5	S1	107	62	0	57,94	53,59
					S2	196	120	0	61,22	
					S3	137	57	0	41,61	

Planta 2013. *Q. faginea* inoculada con *T. aestivum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices		MICORRIZAS		MEDIA	
					<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	<i>Tuber</i>	Planta		
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q.faginea</i>	Si	1	S1	NO HAY PLANTA INOCULADA CON <i>TUBER AESTIVUM</i> CON CARPÓFOROS DE <i>PULVINULA</i>				
					S2					
					S3					
				2	S1					
					S2					
					S3					
				3	S1					
					S2					
					S3					
				4	S1					
					S2					
					S3					
				5	S1					
					S2					
					S3					
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q. faginea</i>	No	1	S1	172	97	0	56,4	65,53
					S2	124	82	0	66,13	
					S3	135	100	0	74,07	
				2	S1	174	114	0	65,52	66,83
					S2	144	91	0	63,19	
					S3	124	89	0	71,77	
				3	S1	162	79	0	48,77	49,83
					S2	110	45	0	40,91	
					S3	112	67	0	59,82	
				4	S1	167	47	0	28,14	32,91
					S2	144	55	0	38,19	
					S3	105	34	0	32,38	
				5	S1	230	165	0	71,74	70,28
					S2	126	82	0	65,08	
					S3	154	114	0	74,03	

Planta 2013. *Q. ilex* inoculada con *T. melanosporum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices		MICORRIZAS		MEDIA	
					<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	<i>Tuber</i>	planta		
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	Si	1	S1		NO HAY PLANTA INOCULADA CON <i>TUBER MELANOSPORUM</i> CON CARPÓFOROS DE <i>PULVINULA</i>			
					S2					
					S3					
				2	S1					
					S2					
					S3					
				3	S1					
					S2					
					S3					
				4	S1					
					S2					
					S3					
				5	S1					
					S2					
					S3					
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	No	1	S1	102	87		85,29	73,68
					S2	116	61	52,59		
					S3	101	84	83,17		
				2	S1	151	114	75,5	55,85	
					S2	129	44	34,11		
					S3	107	62	57,94		
				3	S1	118	69	58,47	49,79	
					S2	103	50	48,54		
					S3	111	47	42,34		
				4	S1	102	64	62,75	36,31	
					S2	103	26	25,24		
					S3	105	22	20,95		
				5	S1	165	75	45,45	38,09	
					S2	117	50	42,74		
					S3	115	30	26,09		

Planta 2013. *Q. faginea* inoculada con *T. melanosporum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices	MICORRIZAS		MEDIA		
						<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q.faginea</i>	Si	1	S1	NO HAY PLANTA INOCULADA CON <i>T. melanosporum</i> CON CARPÓFOROS DE <i>PULVINULA</i>				
					S2					
					S3					
				2	S1					
					S2					
					S3					
				3	S1					
					S2					
					S3					
				4	S1					
					S2					
					S3					
				5	S1					
					S2					
					S3					
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. faginea</i>	No	1	S1	141	22	0	15,6	0
					S2	129	78	0	60,47	0
					S3	128	42	0	32,81	0
				2	S1	162	60	0	37,04	0
					S2	130	53	0	40,77	0
					S3	105	69	0	65,71	0
				3	S1	190	54	79	28,42	41,58
					S2	111	75	0	67,57	0
					S3	121	27	20	22,31	16,53
				4	S1	173	74	13	42,77	7,51
					S2	103	51	12	49,51	11,65
					S3	153	116	0	75,82	0
				5	S1	144	112	0	77,78	0
					S2	118	89	0	75,42	0
					S3	114	97	0	85,09	0

Reserva Planta 2013. *Q. ilex* y *Q. faginea* inoculada con *T. aestivum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices		MICORRIZAS		MEDIA		
							Tuber	Pulvinula	Tuber	PV	Planta
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q. ilex</i>	No	1	S1	137	118	0	86,13	0	55,18
					S2	122	69	0	56,56	0	
					S3	105	24	0	22,86	0	
				2	S1	231	141	0	61,04	0	48,14
					S2	134	61	0	45,52	0	
					S3	103	39	0	37,86	0	
				3	S1	196	107	0	54,59	0	52,82
					S2	101	52	0	51,49	0	
					S3	168	88	0	52,38	0	
				4	S1	234	75	0	32,05	0	10,68
					S2	110	0	0	0	0	
					S3	105	0	0	0	0	
				5	S1	120	56	0	46,67	0	48,99
					S2	122	54	0	44,26	0	
					S3	157	88	0	56,05	0	
INOCULADA	<i>T. aestivum</i>	<i>Q. faginea</i>	No	1	S1	126	108	0	85,71	0	79,09
					S2	100	70	0	70	0	
					S3	141	115	0	81,56	0	
				2	S1	144	83	0	57,64	0	62,42
					S2	110	65	0	59,09	0	
					S3	112	79	0	70,54	0	
				3	S1	149	116	0	77,85	0	71,37
					S2	121	75	0	61,98	0	
					S3	105	78	0	74,29	0	
				4	S1	174	132	0	75,86	0	52,43
					S2	119	54	0	45,38	0	
					S3	111	40	0	36,04	0	
				5	S1	120	57	0	47,5	0	44,63
					S2	116	68	0	58,62	0	
					S3	108	30	0	27,78	0	

Planta 2013. *Q. ilex* y *Q. faginea* inoculada con *T. melanosporum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Ápices		MICORRIZAS		MEDIA		
							<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	<i>Tuber</i>	<i>Pulvinula</i>	
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	No	1	S1	120	56	79 67 8	46,67	0	
					S2	103	74		71,84	0	
					S3	117	73		62,39	0	
				2	S1	110			0	71,82	
					S2	113			0	59,292	
					S3	102			0	7,84	
				3	S1	112	78			69,64	0
					S2	108	81			75	0
					S3	132	104			78,79	0
				4	S1	101	24			23,76	0
					S2	86	34			39,53	0
					S3	102	11			10,78	0
				5	S1	128	114			89,06	0
					S2	153	139			90,85	0
					S3	167	91			54,49	0
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. faginea</i>	No	1	S1	116	65		56,03	0	
					S2	103	75		72,82	0	
					S3	137	100		72,99	0	
				2	S1	153	137		89,54	0	
					S2	109	95		87,16	0	
					S3	203	159		78,33	0	
				3	S1	115	20		17,39	0	
					S2	112	28		25	0	
					S3	110	17		15,45	0	
				4	S1	132	28		21,21	0	
					S2	119	16		13,45	0	
					S3	103	1		0,971	0	
				5	S1	121	37		30,58	0	
					S2	102	38		37,25	0	
					S3	132	34		25,76	0	

Planta 2014. *Q. ilex* inoculada con *T. melanosporum*

TTO.	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Sector/ Ápices		MICORRIZAS		% sectores		% planta	
							<i>Tuber</i>	<i>Pulv</i>	<i>Tuber</i>	<i>Pulv</i>	<i>Tuber</i>	<i>Pulv</i>
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	NO	1	S1	109	64	0	58,72	0	44,78	0
					S2	115	50	0	43,48	0		
					S3	112	36	0	32,14	0		
				2	S1	152	6	0	3,95	0	10,31	1,31
					S2	102	16	4	15,69	3,92		
					S3	115	13	0	11,30	0		
				3	S1	109	18	0	16,51	0	9,841	0
					S2	102	5	0	4,90	0		
					S3	111	9	0	8,11	0		
				4	S1	136	46	0	33,82	0	33,16	0
					S2	106	26	0	24,53	0		
					S3	141	58	0	41,13	0		
				5	S1	104	62	0	59,62	0	38,94	0
					S2	180	64	0	35,56	0		
					S3	134	29	0	21,64	0		
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	SI	1	S1	128	18	16	14,06	12,5	10,51	22,68
					S2	108	14	23	12,96	21,3		
					S3	111	5	38	4,50	34,23		
				2	S1	102	8	14	7,84	13,73	10,52	15,51
					S2	102	14	14	13,72	13,73		
					S3	110	11	21	10	19,09		
				3	S1	131	28	37	21,37	28,24	12,88	12,72
					S2	120	9	8	7,5	6,67		
					S3	123	12	4	9,76	3,25		
				4	S1	121	1	40	0,83	33,06	12,04	16,36
					S2	167	28	19	16,77	11,38		
					S3	108	20	5	18,52	4,63		

Planta 2015. *Q. ilex* inoculada con *T. melanosporum*

TTO	TRUFA	SIMBIONTE	SETAS	PLANTA	Sector/ Ápices		MICORRIZAS		%sectores		%planta					
							Tuber	Pulv.	Tuber	Pulv.	Tuber	Pulv.				
INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	SI	2	S1	117	16	63	13,68	53,85	5,28	45,20				
					S2	143	2	53	1,4	37,06						
					S3	132	1	59	0,76	44,7						
				3	S1	146	2	95	1,37	65,07	0,46	54,05				
					S2	217		119	0	54,84						
					S3	232	0	98	0	42,24						
				7	S1	150	0	52	0	34,67	0	38,38				
					S2	127	0	56	0	44,09						
					S3	110	0	40	0	36,36						
				8	S1	280	0	260	0	92,86	0,30	67,59				
					S2	118	0	90	0	76,27						
					S3	110	1	37	0,91	33,64						
				9	S1	163	0	97	0	59,51	0	60,8				
					S2	130	0	90	0	69,23						
					S3	123	0	66	0	53,66						
				INOCULADA	<i>T. melanosporum</i>	<i>Q. ilex</i>	No	1	S1	170	3	106	1,76	62,35	2,34	44,60
									S2	107	2	42	1,87	39,25		
									S3	118	4	38	3,39	32,2		
4	S1	189	23					59	12,17	31,22	4,28	33,12				
	S2	135	0					71	0	52,59						
	S3	148	1					23	0,68	15,54						
5	S1	177	40					87	22,6	49,15	36,82	27,23				
	S2	176	53					36	30,11	20,45						
	S3	116	67					14	57,76	12,07						
6	S1	132	21					49	15,91	37,12	6,84	25,03				
	S2	154	6					38	3,9	24,68						
	S3	143	1					19	0,7	13,29						
10	S1	125	61					23	48,8	18,4	49,75	8,4209				
	S2	118	63					0	53,39	0						
	S3	102	48					7	47,06	6,863						

Planta 2015. *Q. ilex* testigo

TTO.	SIMB	SETAS	PLANTA	Sector/ Ápices	MICORRIZAS		%sectores		%planta	
					Tuber	Pulv.	Tuber	Pulv	Tuber	Pulvinula
TESTIGO	<i>Q. ilex</i>	SI	1	S1	227		42		18,5	15,23
				S2	143		19		13,29	
				S3	115		16		13,91	
			2	S1	133		49		36,84	38,40
				S2	119		52		43,7	
				S3	150		52		34,67	
			3	S1	134		115		85,82	75,35
				S2	110		77		70	
				S3	141		99		70,21	
			4	S1	138		109		78,99	73,54
				S2	109		85		77,98	
				S3	176		112		63,64	
			5	S1	148		101		68,24	30,97
				S2	117		21		17,95	
				S3	104		7		6,731	
TESTIGO	<i>Q. ilex</i>	No	1 (6)	S1	131		100		76,34	50,98
				S2	103		61		59,22	
				S3	115		20		17,39	
			2 (7)	S1	208		182		87,5	35,53
				S2	111		3		2,703	
				S3	122		20		16,39	
			3 (8)	S1	138		38		27,54	32,01
				S2	174		33		18,97	
				S3	212		105		49,53	
			4 (9)	S1	164		82		50	26,53
				S2	117		29		24,79	
				S3	104		5		4,808	
			5 (10)	S1	161		60		37,27	32,82
				S2	155		69		44,52	
				S3	102		17		16,67	

Capturas y sexo de los adultos capturados en las tres parcelas de estudio durante la campaña 2016-2017. T: Total de adultos capturados; M: Machos; H: Hembras.

Parcela	Fecha	1T	1 M	1H	2 T	2 M	2 H	3 T	3M	3 H	4 T	4M	4 H	5 T	5 M	5 H	6 T	6 M	6 H	7 T	7 M	7 H	8 T	8 M	8 H	
1	03/10/2016																				1	0	1	1	1	0
1	10/10/2016																				2	2	0	0	0	0
1	18/10/2016																				1	1	0	0	0	0
1	25/10/2016																				5	3	2	1	1	0
1	02/11/2016																				1	1	0	0	0	0
1	09/11/2016																				2	2	0	0	0	0
1	16/11/2016	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	6	3	3	0	0	0	0	0	0	
1	23/11/2016																									
1	30/11/2016	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
1	07/12/2016	1	1	0	4	4	0	7	6	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	3	3	0	1	1	0	
1	14/12/2016	2	1	1	3	2	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0	4	4	0	6	5	1	3	1	2	
1	21/12/2016																			4	2	2	5	4	1	
1	28/12/2016	7	4	3	14	11	3	2	2	0	20	14	6	0	0	0	3	2	1	6	5	1	1	1	0	
1	04/01/2017																			12	7	5	0	0	0	
1	11/01/2017	7	3	4	3	3	0	15	9	6	7	6	1	0	0	0	6	1	5	6	3	3	8	5	3	
1	18/01/2017	5	2	3	3	3	0	7	3	4	7	5	2	1	1	0	1	1	0	4	2	2	2	1	1	
1	25/01/2017																									
1	01/02/2017																									
1	08/02/2017	5	4	1	1	1	0	2	1	1	2	0	2	3	3	0	4	4	0	10	6	4	5	3	2	
1	15/02/2017																			4	1	3	0	0	0	
1	22/02/2017	9	6	3	4	1	3	5	2	3	10	6	4	6	4	2	5	3	2	3	2	1	1	1	0	
1	01/03/2017	3	2	1	3	1	2	0	0	0	1	0	1	1	0	1	3	1	2	1	1	0	4	3	1	
1	08/03/2017	1	1	0	5	2	3	0	0	0	2	0	2	2	1	1	8	3	5	1	0	1	1	0	1	

Parcela	Fecha	1T	1 M	1H	2 T	2 M	2 H	3 T	3M	3 H	4 T	4M	4 H	5 T	5 M	5 H	6 T	6 M	6 H	7 T	7 M	7 H	8 T	8 M	8 H
1	15/03/2017	3	2	1	4	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	10	5	5	2	1	1	2	2	0
1	22/03/2017	2	1	1	1	0	1	1	0	1	3	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	29/03/2017	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	05/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	12/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	19/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	26/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	03/05/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10/05/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	03/10/2016																								
2	10/10/2016																								
2	18/10/2016																								
2	25/10/2016																								
2	02/11/2016																								
2	09/11/2016																								
2	16/11/2016	9	7	2	2	1	1	11	4	7	22	12	10	4	2	2	9	6	3						
2	23/11/2016																								
2	30/11/2016																								
2	07/12/2016	9	6	3	9	7	2	15	8	7	14	12	2	22	15	7	6	3	3						
2	14/12/2016	3	2	1	2	1	1	5	4	1	19	15	4	27	20	7	13	9	4						
2	21/12/2016																								
2	28/12/2016	20	14	6	9	8	1	37	27	10	10	5	5	20	9	11	22	13	9						
2	04/01/2017																								
2	11/01/2017	36	15	21	25	10	15	14	7	7	13	8	5	23	12	11	18	8	10						
2	18/01/2017	20	10	10	6	3	3	5	4	1	8	4	4	20	11	9	10	4	6						
2	25/01/2017																								

Parcela	Fecha	1T	1 M	1H	2 T	2 M	2 H	3 T	3M	3 H	4 T	4M	4 H	5 T	5 M	5 H	6 T	6 M	6 H	7 T	7 M	7 H	8 T	8 M	8 H
2	01/02/2017																								
2	08/02/2017	16	14	2	23	12	11	2	1	1	7	5	2	1	1	0	1	0	1						
2	15/02/2017																								
2	22/02/2017	3	2	1	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	01/03/2017	6	2	4	0	0	0	3	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0						
2	08/03/2017	3	2	1	0	0	0	7	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	15/03/2017	0	0	0	0	0	0	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	22/03/2017	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0						
2	29/03/2017	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	05/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	12/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	19/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	26/04/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	03/05/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
2	10/05/2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
3	03/10/2016	2	2	0	0	0	0																		
3	10/10/2016	3	1	2	2	1	1																		
3	18/10/2016	2	2	0	2	1	1																		
3	25/10/2016	12	7	5	3	2	1																		
3	02/11/2016	8	3	5	3	2	1																		
3	09/11/2016	1	1	0	0	0	0																		
3	16/11/2016	1	0	1	1	0	1																		
3	23/11/2016																								
3	30/11/2016																								
3	07/12/2016	1	1	0	0	0	0																		
3	14/12/2016	3	2	1	1	1	0																		

Parcela	Fecha	1T	1M	1H	2T	2M	2H	3T	3M	3H	4T	4M	4H	5T	5M	5H	6T	6M	6H	7T	7M	7H	8T	8M	8H
3	21/12/2016	5	1	4	3	1	2																		
3	28/12/2016	3	1	2	2	2	0																		
3	04/01/2017	10	2	8	7	3	4																		
3	11/01/2017	0	0	0	1	0	1																		
3	18/01/2017	4	0	4	3	1	2																		
3	25/01/2017																								
3	01/02/2017																								
3	08/02/2017	7	0	7	2	1	1																		
3	15/02/2017	2	1	1	3	1	2																		
3	22/02/2017	8	2	6	2	1	1																		
3	01/03/2017	8	1	7	7	1	6																		
3	08/03/2017	15	3	12	5	1	4																		
3	15/03/2017	14	2	12	5	0	5																		
3	22/03/2017	1	0	1	0	0	0																		
3	29/03/2017	1	0	1	0	0	0																		
3	05/04/2017	2	1	1	0	0	0																		
3	12/04/2017	0	0	0	0	0	0																		
3	19/04/2017	2	0	2	0	0	0																		
3	26/04/2017	0	0	0	0	0	0																		
3	03/05/2017	0	0	0	0	0	0																		
3	10/05/2017	0	0	0	0	0	0																		

Capturas y sexo de los adultos capturados en las tres parcelas de estudio durante la campaña 2016-2017 M: Machos; H: Hembras.

Parcela	Fecha	1M	1H	2 M	2 H	3M	3 H	4M	4 H	5 M	5 H	6 M	6 H	7 M	7 H	8 M	8 H	9 M	9 H	10 M	10H	11 M	11 H	12 M	12 H
1	6/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	20/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	27/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	04/10	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	11/10	0	3	2	0	3	2	3	1	0	0	0	3	4	1	2	0	0	1	2	0	1	1	3	0
1	18/10	13	8	12	4	9	3	9	1	1	2	6	0	6	4	2	2	1	0	3	2	9	9	5	4
1	25/10	11	12	7	7	8	9	23	14	1	2	1	1	8	4	1	5	0	0	5	3	12	6	4	6
1	31/10	16	14	18	5	20	12	35	13	1	1	0	0	5	4	7	1	2	1	7	4	9	1	11	14
1	08/11	4	2	10	6	5	5	7	5	1	0	3	2	5	5	5	4	3	7	4	6	2	1	7	4
1	15/11	4	4	10	12	17	11	5	3	0	2	3	0	10	9	2	5	3	6	10	10	2	4	7	12
1	22/11	11	13	6	7	7	7	6	3	0	0	1	0	16	20	8	16	8	10	7	10	4	8	8	6
1	29/11	7	5	5	3	6	3	6	6	1	1	2	0	5	5	9	6	8	11	6	3	2	2	2	2
1	05/12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	2	0	3	2	3	0	0
1	13/12	2	10	6	1	3	1	1	2	1	1	6	0	0	2	2	3	4	9	9	9	1	5	1	0
1	20/12	2	0	6	11	3	6	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	2	3	2	4	1	2	1	1
1	27/12	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1	03/01	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	10/01	0	1	0	1	0	4	0	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1	17/01	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	24/01	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	3	0	0
1	31/01	0	2	0	6	0	0	2	2	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1
1	07/02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0

Parcela	Fecha	1M	1H	2 M	2 H	3M	3 H	4M	4 H	5 M	5 H	6 M	6 H	7 M	7 H	8 M	8 H	9 M	9 H	10 M	10H	11 M	11 H	12 M	12 H
1	14/02	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
1	21/02	1	0	2	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1
1	28/02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	07/03	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0
1	14/03	1	3	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1	21/03	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	28/03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	04/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	11/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	18/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	25/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	02/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	09/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	13/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	20/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	27/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1												
2	04/10	1	1	3	1	0	0	0	1	0	1	0	0												
2	11/10	1	0	4	3	1	0	5	8	8	10	7	7												
2	18/10	112	61	59	25	24	16	91	57	45	41	35	26												
2	25/10	105	65	74	50	33	32	54	41	31	22	34	23												
2	31/10	91	93	55	46	41	42	59	40	18	17	29	26												
2	08/11	38	35	25	24	8	5	9	12	14	13	13	11												
2	15/11	74	73	85	60	16	26	23	22	22	25	11	15												
2	22/11	78	74	77	111	39	62	39	61	23	35	17	34												
2	29/11	16	32	27	36	12	23	10	29	18	10	25	36												

Parcela	Fecha	1M	1H	2 M	2 H	3M	3 H	4M	4 H	5 M	5 H	6 M	6 H	7 M	7 H	8 M	8 H	9 M	9 H	10 M	10H	11 M	11 H	12 M	12 H
2	05/12	5	4	0	0	0	2	0	1	0	2	0	4												
2	13/12	52	35	14	30	14	25	11	21	6	5	22	27												
2	20/12	34	55	14	13	5	11	2	8	7	5	16	49												
2	27/12	18	28	6	9	5	13	0	5	5	6	6	29												
2	03/01	12	7	5	8	1	7	2	3	1	4	2	4												
2	10/01	6	14	7	1	4	4	1	3	0	1	5	7												
2	17/01	10	8	2	4	2	2	0	2	1	0	1	9												
2	24/01	6	18	15	22	2	5	2	7	2	7	0	0												
2	31/01	7	11	7	16	4	2	1	1	1	4	5	14												
2	07/02	13	13	7	17	1	1	0	1	0	1	0	0												
2	14/02	3	10	1	7	2	0	0	2	1	2	2	2												
2	21/02	3	5	7	24	1	6	1	2	0	0	1	1												
2	28/02																								
2	07/03	12	15	7	17	1	1	0	1	0	1	0	0												
2	14/03	4	4	1	6	0	0	0	0	0	0	0	2												
2	21/03	2	5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0												
2	28/03	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	04/04	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1												
2	11/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	18/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	25/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	02/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
2	09/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	6/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	13/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	20/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												

Parcela	Fecha	1M	1H	2 M	2 H	3M	3 H	4M	4 H	5 M	5 H	6 M	6 H	7 M	7 H	8 M	8 H	9 M	9 H	10 M	10H	11 M	11 H	12 M	12 H
3	27/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1												
3	04/10	0	0	3	1	0	1	0	0	2	0	1	0												
3	11/10	1	0	12	5	6	6	6	3	7	8	9	6												
3	18/10	7	0	2	7	26	16	8	4	40	31	24	16												
3	25/10	1	1	25	15	25	19	3	0	26	18	24	14												
3	31/10	21	11	16	18	7	4	10	8	23	16	20	10												
3	08/11	23	12	16	17	10	8	11	9	17	17	17	9												
3	15/11	18	22	41	38	7	5	21	15	21	34	21	23												
3	22/11	36	69	18	22	21	17	44	52	25	25	23	62												
3	29/11	33	45	47	36	25	52	56	76	34	21	23	48												
3	05/12	6	5	3	4	0	4	4	1	9	8	2	2												
3	13/12	13	26	14	24	6	18	0	4	8	7	9	32												
3	20/12	7	21	21	19	2	7	13	27	23	30	7	24												
3	27/12	3	6	0	7	1	3	1	1	7	8	1	3												
3	03/01	0	0	0	3	1	4	0	2	6	6	2	4												
3	10/01	3	5	0	4	1	3	2	4	3	11	8	2												
3	17/01	1	2	2	2	1	3	0	0	4	2	0	3												
3	24/01	0	0	1	2	0	3	0	6	1	0	0	1												
3	31/01	0	0	0	1	0	0	0	6	1	0	0	0												
3	07/02	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0												
3	14/02	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3												
3	21/02	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0												
3	28/02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	07/03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1												
3	14/03	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0												
3	21/03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												

Parcela	Fecha	1M	1H	2 M	2 H	3M	3 H	4M	4 H	5 M	5 H	6 M	6 H	7 M	7 H	8 M	8 H	9 M	9 H	10 M	10H	11 M	11 H	12 M	12 H
3	28/03	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	04/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	11/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	18/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	25/04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	02/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
3	09/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												