



e s c u e l a
p o l i t é c n i c a
s u p e r i o r
d e h u e s c a



**UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA**

PROYECTO- TRABAJO FIN DE CARRERA

**ARTRÓPODOS PARÁSITOS ASOCIADOS A
CARPÓFOROS DEL GÉNERO *TUBER*.**

AUTOR: LOURDES CASTEL DUASO

ENSEÑANZA: INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA

DIRECTOR/ES: JUAN J. BARRIUSO VARGAS

MARÍA MARTÍN SANTAFÉ

PONENTE: JOAQUÍN AIBAR LETE

FECHA: JUNIO 2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han apoyado y ayudado durante la realización de este trabajo:

A mi director de proyecto, el Dr. Juan Barriuso por su confianza en mí y brindarme la oportunidad de colaborar en este sorprendente y novedoso trabajo. He disfrutado aprendiendo de sus conocimientos y debatiendo los resultados juntos. Has conseguido que me sintiera como una auténtica científica aportando algo de luz a este tema. Me quedo con ganas de seguir por este camino. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con un equipo tan auténtico y descubrirme el mundo real de la investigación y la truficultura.

Quiero también agradecer a mi directora de proyecto María Martín todo su esfuerzo realizado en este trabajo. Los momentos compartidos en el laboratorio han sido mucho más amenos y productivos, gracias María.

Gracias al Dr. Sergio Sánchez por su disponibilidad, colaboración, por compartir sus conocimientos, experiencia y portarse conmigo como un amigo, sin conocerme de nada. Gracias por darme el apoyo y la motivación que necesitaba en la última etapa de este trabajo.

Al resto del personal del Servicio de Investigación Agroalimentaria y concretamente a la Unidad de Sanidad Vegetal. Gracias a su inmejorable trato han hecho de mi estancia un periodo muy agradable.

Por último, aunque no menos importante, me gustaría agradecer y dedicar este proyecto a mis padres, a mi hermano y a mi pareja. Esto no hubiera sido posible sin mi obcecación y sin el inestimable apoyo familiar a lo largo de todos estos años, con infinito cariño y paciencia, quizá el microscopio que me regalasteis a los 7 años ha influido para llegar a este proyecto.

A los amigos, gracias por vuestro incondicional apoyo, por preocuparos por cómo iban las trufas aunque no entendiéis de la misa la mitad. Gracias por estar siempre ahí, ya habrá tiempo para celebraciones.

RESUMEN/SUMMARY

En los últimos años la producción de trufas silvestres ha descendido de un modo alarmante, y por el momento ni el establecimiento de un gran número de plantaciones, de árboles del género *Quercus* micorrizadas con este hongo han conseguido que remonten las producciones. Por otra parte encontramos que su calidad esta gravemente influida por la presencia de artrópodos parásitos.

No se posee mucha información sobre las principales plagas que afectan a la trufa ni cómo controlarlas. En este trabajo se han estudiado las poblaciones de artrópodos presentes en las especies económicamente más importantes en España distintos ejemplares de trufa de verano (*Tuber aestivum*), trufa negra (*Tuber melanosporum*) y *Tuber brumale*, con la intención de identificar y comprobar el grado de parasitismo de las especies que afectan.

Se han encontrado 5 especies diferentes: *Leiodes cinnamomea*, *Ommatoilus sabulosus*, *Megaselia* sp., *Lycoriella* sp., y *Helomyza tuberivora*. De estos 3 últimos se ha conseguido reproducir su ciclo biológico completo sobre *Tuber* y *Pleurotus ostreatus*. *Ommatoilus sabulosus*, *Megaselia* sp. y *Lycoriella* sp. son nuevas citas en cuanto al parasitismo asociado a los carpóforos del género *Tuber*.

Los dípteros *Megaselia* sp, *Lycoriella* sp. y *Helomyza tuberivora* son plagas que provocan graves pérdidas en la calidad del producto, pero también ayudan al hongo a diseminar sus esporas, a la par que son indicadores de su presencia en el quemado del árbol trufero.

La presencia de *Ommatoilus sabulosus* se asocia como plaga secundaria, ya que parasita a *T. melanosporum* cuando esta se encuentra ya madura, aprovechando las galerías creadas previamente ya por otros parásitos, provocando graves perforaciones que devalúan económicamente y en calidad el producto.

Se ha podido comprobar que a diferencia de lo publicado en otros trabajos respecto al coleóptero *Leiodes cinnamomea*, que las larvas son parásitos tanto de *T. aestivum* como de *T. melanosporum* frente a los adultos que sólo se manifiestan en *T. melanosporum*, produciendo tanto la larva como el adulto graves daños en los carpóforos.

Con los resultados obtenidos se pretende aportar algo de luz al parasitismo asociado a carpóforos del género *Tuber* para poder establecer, en estudios posteriores,

posibles estrategias de control de estos artrópodos en las truferas, evitando así pérdidas tanto económicas como en la calidad de tan apreciado producto.

In recent years the production of wild truffles has dropped alarmingly, and at the moment not even the establishment of a large number of trees plantations of the gender *Quercus* mycorrhizal with this fungus have achieved that date back production. Moreover we find that the quality is seriously influenced by the presence of arthropod parasites.

Not much information is had of the major diseases which affect the truffle or how to control it. In this research we have studied arthropod populations present in the most economically important species in Spain different samples of summer truffle (*Tuber aestivum*), black truffle (*Tuber melanosporum*) and *Tuber brumale*, in order to identify and assess the degree of parasitism of the species they affect.

5 different species have been found: *Leiodes cinnamomea*, *Ommatoilus sabulosus*, *Megaselia* sp, *Lycoriella* sp and *Helomyza tuberivora*. Of these last 3 it has been managed to reproduce their entire life cycle of *Tuber* and *Pleurotus ostreatus*. *Ommatoilus sabulosus*, *Megaselia* sp. and *Lycoriella*. are new records in terms of parasitism associated with sporocarps of the gender *Tuber*.

The dipterans *Megaselia* sp, *Lycoriella* Sp. and *Helomyza tuberivora* are pests that cause severe losses in the product quality, but they also help the fungus to spread its spores, along with they are indicators of its presence in the truffle tree burning.

The presence of *Ommatoilus sabulosus* associated as a secondary pest, because that parasitizes *T. melanosporum* when it is mature, using pre-built galleries formerly made by- other parasites, causing serious drillings that devalue economically and the quality of-the product.

It has been found that, unlike other published studies in relation to *Leiodes cinnamomea* beetle, larvae are parasites of both, *T. aestivum* and *T. melanosporum*. This is a difference with adults which only appear in *T. melanosporum*, causing both (larvae and adult) severe damage to the fruiting bodies.

The results obtained are intended to bring some light to the parasitism associated with the gender *Tuber* fruiting bodies to establish in future studies, possible strategies of controlling these arthropods in the truffle, thus avoiding losses in both economic and in the so appreciated quality of the product.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY

	<u>Pág.</u>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. LA TRUFA	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	5
1.1.2. CICLO BIOLÓGICO.....	7
1.1.3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA TRUFICULTURA	10
1.2. PRINCIPALES PARÁSITOS ASOCIADOS A CARPÓFOROS DEL GÉNERO <i>Tuber</i> .	11
1.2.1. CAUSAS DEL OLOR DE LA TRUFA Y DEL PORQUÉ SE VEN	
ATRAÍDOS DIFERENTES ARTRÓPODOS	13
1.2.2. CÓMO ACTÚAN LOS ARTRÓPODOS EN LA DISEMINACIÓN	
DE ESPORAS	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. MATERIAL FÚNGICO.....	18
3.1.1. MATERIAL FÚNGICO I: <i>Tuber aestivum</i>	19
3.1.2. MATERIAL FÚNGICO II: <i>Tuber melanosporum</i>	20
3.1.3. MATERIAL FÚNGICO III: <i>Tuber brumale</i> , <i>Tuber aestivum</i> y	
<i>Tuber melanosporum</i>	21
3.1.4. MATERIAL FÚNGICO IV: <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacques Fries) Kumm	22
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	24
3.2.1. ENSAYO 1: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE	

<i>T. aestivum</i> Vittad.....	27
3.2.1.1. EVOLUCIÓN DE LARVAS DE COLEÓPTEROS.....	27
3.2.1.2. COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE LARVAS Y AISLAMIENTO DE LAS MISMAS.....	28
3.2.1.3. COLOCACIÓN DE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> EN EL ENSAYO	29
3.2.1.4. COMPROBACIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>MEGASELIA</i> SP.	30
3.2.2. ENSAYO 2: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE <i>T. MELANOSPORUM</i> VITTAD.....	31
3.2.2.1. COMPROBACIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>LYCORIELLA</i> SP. Y DE <i>HELOMYZA TUBERIVORA</i>	32
3.2.3. ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE LA EVOLUCIÓN FINAL DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A DISTINTOS EJEMPLARES DE <i>TUBER</i>	33
3.2.4. ENSAYO 4: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE EL LAMINADO DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A <i>TUBER MELANOSPORUM</i> VITTAD EN FUNCIÓN DEL GRADO DE MADUREZ.....	34
3.2.4.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS ARTRÓPODOS PARÁSITOS PRESENTES.....	40
4.2. ENSAYO 1: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE <i>T. AESTIVUM</i> VITTAD	41
4.2.1. EVOLUCIÓN DE LAS LARVAS ENCONTRADAS	42
4.2.2. OBTENCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>MEGASELIA</i> SP.	44
4.3. ENSAYO 2: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE <i>T. MELANOSPORUM</i> VITTAD	48
4.3.1. <i>Ommatoilus sabulosus</i>	50
4.3.2. <i>Leiodes cinnamomea</i>	51
4.3.3. <i>Lycoriella</i> sp.	53

4.3.4. <i>Helomyza tuberivora</i>	55
4.4. ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE LA EVOLUCIÓN FINAL DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A DISTINTOS EJEMPLARES DE <i>TUBER</i>:	58
4.4.1. <i>Tuber aestivum</i> Vittad.....	58
4.4.2. <i>Tuber melanosporum</i> Vittad.....	58
4.4.3. <i>Tuber brumale</i> Vittad.....	59
4.5. ENSAYO 4: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE EL LAMINADO DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A <i>TUBER MELANOSPORUM VITTAD</i> EN FUNCIÓN DEL GRADO DE MADUREZ	61
4.5.1. PRESENCIA DE GALERÍAS	61
4.5.2. NÚMERO DE GALERÍAS.....	62
4.5.3. TIPO DE GALERÍAS.....	63
4.6. DAÑOS Y POSIBILIDADES DE CONTROL DE LOS DISTINTOS PARÁSITOS ENCONTRADOS EN <i>TUBER</i>	66
4.6.1. COLEÓPTEROS	66
4.6.2. MIRIÁPODOS	66
4.6.3. DÍPTEROS.....	67
4.6.3.1. <i>Megaselia</i> sp.....	67
4.6.3.2. <i>Lycoriella</i> sp.....	68
4.6.3.3. <i>Helomyza tuberivora</i>	68
4.6.3.4. POSIBLES SOLUCIONES PARA EL CONTROL DE DÍPTEROS	
Y RESTO DE ARTRÓPODOS EN LAS TRUFERAS	69
5. CONCLUSIONES	70
6. BIBLIOGRAFÍA	71

FIGURAS

Fig.1. Distribución de suelos con aptitudes truferas para <i>Tuber melanosporum</i> en Europa (Reyna, 2012).	2
Fig.2. Plantación trufera en la zona Graus (Huesca) (foto superior) y de Sarrión (Teruel) (foto inferior).	3
Fig.3. Representación de las zonas españolas aptas para la producción de <i>Tuber melanosporum</i> y <i>Tuber aestivum</i> en función del tipo de suelo, ya sea silíceo, calcáreo o arcilloso (Mapa cedido por Sanchez, S. 2012).	4
Fig.4. Peridio, gleba y esporas de <i>Tuber melanosporum</i>	6
Fig.5. Peridio, gleba y esporas de <i>Tuber aestivum</i>	7
Fig.6. Peridio, gleba y esporas de <i>Tuber brumale</i>	7
Fig.7. Ciclo biológico de <i>T. melanosporum</i> modificado de (Kües y Martin, 2011).	8
Fig.8. Trufera joven con quemado en torno al árbol situada en una plantación de Valbona (Teruel).	9
Fig.9. Producción mundial de trufa (Reyna, 2007).	10
Fig.10. Producción de trufa por provincia Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente 2008.	11
Fig.11. Ejemplar parasitado de <i>Tuber melanosporum</i> . Se aprecian diversas galerías.	13
Fig.12. <i>Helomyza tuberivora</i> también conocida como mosca de la trufa, con esporas adheridas en las patas, lo que es indicador de la dispersión de esporas.	15
Fig.13. Larva de díptero con esporas de <i>Tuber</i> tanto en el interior como adheridas en la parte externa.	16
Fig.14. Lotes de <i>Tuber aestivum</i> , el de la derecha al estar cerrado herméticamente se produjo la muerte de las larvas por asfixia.	19
Fig.15. Lote de <i>Tuber melanosporum</i> procedente de Sarrión.	21
Fig.16. Pesado y etiquetado de los carpóforos.	24

Fig.17. Colocación de los ejemplares de <i>Tuber</i> a evolucionar.	25
Fig.18. Aplicación de humedad mediante pulverizador y aislamiento del ensayo para evitar contaminaciones y evitar la incidencia de la luz.	25
Fig.19. Ubicación de los carpóforos dentro de los evolucionarios	26
Fig.20. Nicho de coleópteros dentro de <i>Tuber aestivum</i>	27
Fig.21. Estudio de las larvas de coleóptero.	28
Fig.22. Ejemplares de <i>Pleurotus ostreatus</i> que sirven de alimento a los parásitos asociados al género <i>Tuber</i>	29
Fig.23. Colocación de ejemplares frescos para ver si desarrollaban algún tipo de plagas por ellos solos. Sin la presencia de los carpóforos.	30
Fig.24. Colocación del ensayo.	30
Fig.25. <i>Megaselia</i> sp. junto los <i>Pleurotus ostreatus</i>	30
Fig.26. Adulto de <i>Megaselia</i> sp.	30
Fig.27. Ubicación del ensayo en el laboratorio.	31
Fig 28. Vista al microscopio de ascas y ascosporas de <i>Tuber melanosporum</i> en su mayoría maduras (izquierda).	35
Fig.29. Vistas al microscopio de ascas de maduración media (derecha)	35
Fig.30. Vista al microscopio de ascas y ascosporas inmaduras.	35
Fig. 31. Carpóforo de <i>Tuber</i> que presenta gran cantidad de galerías de diplopodo, coleóptero y díptero.	36
Fig.32. Galerías producidas por coleópteros y diplopodos (derecha) y por diplopodos (izquierda).	36
Fig.33. Laminado de los diferentes lotes de trufa para su evaluación de daños en la gleba producido por los parásitos.	37
Fig.34. Galerías producidas por coleópteros y dípteros (izquierda) y por diplopodos (derecha).	37
Fig.35. Evaluación de la presencia de larvas vivas en el ensayo.	42
Fig 36. Láminas de <i>Tuber aestivum</i> parasitadas por <i>Leiodes cinnamomea</i>	43
Fig.37. Adulto de <i>Leiodes cinnamomea</i> . Su tamaño es de 0,5 cm.	51

Fig.38. Pupas de <i>Helomyza tuberivora</i> y <i>Megaselia</i> sp en el mismo carpóforo (izquierda), <i>Helomyza tuberivora</i> sobre <i>Pleurotus ostreatus</i>	59
Fig.39. Daños producidos por dípteros, coleópteros y milpiés.....	63

TABLAS

Tabla 1. Superficie dedicada al cultivo de trufa negra en España (ha) (J. Vilas, 2011).	5
Tabla 2. Características de los lotes de trufas utilizadas en este trabajo.	23
Tabla 3. Número de parásitos evaluados visualmente en distintas fases, localizados en <i>Tuber aestivum</i>	41
Tabla 4. Relación de las temperaturas junto con la evaluación visual de la presencia de larvas de coleóptero en el ensayo.	44
Tabla 5. Presencia de <i>Megaselia</i> sp. en el ensayo, en relación con la variación de temperaturas.	45
Tabla 6. Ciclo de <i>Megaselia</i> sp. obtenido en el laboratorio.	47
Tabla 7. Número de parásitos evaluados visualmente en sus distintas fases, localizados en <i>Tuber melanosporum</i>	48
Tabla 8. Evolución de las temperaturas máxima, mínima y media junto con las especies de adultos parásitos propios de <i>T. melanosporum</i> que aparecieron durante el tiempo que perduró el ensayo, colocados en orden de aparición.	49
Tabla 9. Ejemplares de <i>Ommatoilus sabulosus</i> , encontrados parasitando la trufa, su longitud alcanza los 2 cm.	50
Tabla 10. Tabla en la que aparece reflejado los distintos estadios observados <i>Leiodes cinnamomea</i> sobre <i>Tuber melanosporum</i>	52
Tabla 11. Evolución del ciclo de <i>Lycoriella</i> sp. comprobado en el laboratorio sobre <i>Tuber melanosporum</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	54
Tabla 12. Evolución de las temperaturas durante el ciclo de <i>Helomyza tuberivora</i> . La bajada drástica de las temperaturas provocó la muerte de los adultos.	55
Tabla 13. Comprobación del ciclo de <i>Helomyza tuberivora</i> sobre <i>Tuber melanosporum</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	56
Tabla 14. Relación cuantificada de las especies vinculadas a la trufa que han sido obtenidas en el presente ensayo.	60
Tabla 15. Tabla de contingencia que muestra las frecuencias de la presencia de galerías en función del tipo de madurez del lote de <i>T. melanosporum</i>	61

Tabla 16. Resultados de la prueba de χ^2 (valor χ^2 y significación $p < 0,05$) para cada combinación dos a dos de los grados de maduración. ns: prueba no significativa.	62
Tabla 17. Separación en grupos homogéneos de frecuencia de aparición de larvas en función del grado de madurez.	62
Tabla 18. Número de trufas analizadas, número medio de galerías y desviación típica en función del grado de madurez de los lotes analizados. Resultados de la ANOVA (F y p) y separación de medias por el test de Tukey. Los lotes que no comparten letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$).	63
Tabla 19. Frecuencia de aparición de daños producidos por los tres diferentes grupos de artrópodos considerados en los tres niveles de madurez de los carpóforos de <i>Tuber melanosporum</i> . Resultados de la prueba de χ^2 (valor χ^2 y significación p) para cada combinación dos a dos de los grados de maduración. ns: ausencia de diferencias significativas. Las frecuencias que no comparten letra poseen diferencias significativas entre sí; $p > 0,05$	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA TRUFA

Las trufas son los cuerpos fructíferos de hongos hipogeos, entre los que se encuentran géneros como *Terfezia* o *Melanogaster*. Pero las especies más apreciadas por su valor gastronómico pertenecen al género *Tuber*, familia *Tuberaceae*, orden *Pezizales*, clase *Pezizomycetes*, división *Ascomycota*, reino *Fungi* (Kirk *et al.*, 2008).

Dichos hongos se encuentran asociados a las raíces de ciertas especies vegetales como son la encina o carrasca (*Quercus ilex* subsp. *Ballota* (Desf.) Samp. In Bol.), el quejigo (*Quercus faginea* Lam.), el roble pubescente (*Quercus pubescens*) y el avellano (*Corylus avellana* L.), formando unas estructuras denominadas micorrizas. La zona comprendida entre el árbol y su área superficial donde se recolectan los carpóforos se conoce como trufiera.

Esta fructificación suele ser muy aromática, cualidad que le confiere un alto valor culinario para los humanos y permite su recolección por medio de perros. A su vez es este aroma el que atrae a distintos tipos de parásitos que son el objetivo de estudio de este trabajo.

Las truferas se desarrollan en suelos pobres, que carecen de los nutrientes esenciales para la supervivencia del árbol, siendo el hongo el encargado de proporcionar a la planta lo que ésta no es capaz de asimilar directamente del suelo. A su vez, reviste a las raíces del árbol con su micelio, protegiéndolas y formando las micorrizas. A cambio la planta aporta al hongo los productos que éste es incapaz de sintetizar por sí mismo y un sustrato sobre el que poder reproducirse.

La relación hongo-planta se encuentra en un equilibrio inestable, lo que hace que la truficultura sea una ciencia/actividad difícilmente pronosticable/predecible, estando muy influida por factores climáticos y por ciertas actuaciones sobre el cultivo que pueden influir y comprometer su éxito (Martín *et al.*, 2010).

Aunque las tres especies de este estudio son objeto de un comercio muy activo, la trufa negra es la especie más importante que se recoge en nuestra zona, tanto por el volumen económico como por su relevante uso en cocina, debido a sus características organolépticas. Este hongo sólo se desarrolla de forma silvestre en los suelos calcáreos del sur de Europa [Fig.1]. Esto incluye: Francia, Italia y España, aunque en los últimos

años ha sido introducida en otros países como Estados Unidos, Chile, Israel, Nueva Zelanda o Australia (García *et al.*, 2004).



Fig.1. Distribución de suelos con aptitudes truferas para *Tuber melanosporum* en Europa (Reyna, 2012).

T. melanosporum se encuentra en terrenos que están entre 600 y 1.200 metros de altitud sobre el nivel del mar, en exposiciones normalmente al sur que pasan a ser orientación norte conforme se descende en latitud, y con precipitaciones que se encuentran repartidas en las estaciones de primavera y otoño entre los 425 y 1.500 mm/año. El clima xérico con tendencia continental es el óptimo para la trufa. Las características principales de este clima son la diferencia de temperaturas extremas, en contraste de día-noche, tanto en verano como en invierno (Alonso *et al.*, 2010).

Los suelos presentan un pH básico, entre 7,5 y 8,5, bajos niveles de materia orgánica (entre un 1 y un 10%) y relación C/N entre 5 y 20. Son de textura equilibrada, de tipo franco y estructura granular, sueltos, poco profundos, y con buena aireación y buena circulación de agua por los poros [Fig.2]. Suelen presentar una alta pedregosidad, con ligera pendiente y soleados (Oliach *et al.*, 2005).

Todas las características anteriormente comentadas encajan perfectamente con una gran parte de la superficie rural del territorio aragonés, así como otras comunidades de la zona caliza de la Península Ibérica [Fig.3].

En mayor o menor medida se conocen los factores favorables para la producción de trufa, pero aún teniéndolos en cuenta es necesario esperar en algunas plantaciones hasta 15 años y otras nunca llegarán a producir trufa (De Miguel y Sáez 2008).

La caza (recolección) se suele llevar a cabo mediante perros adiestrados. Las trufas se hallan entre 10-40 cm de profundidad. A veces se puede reconocer su presencia por la ausencia de vegetación o “quemado” en torno al árbol productor.



Fig.2. Plantación trufera en la zona Graús (Huesca) (foto superior) y de Sarrión (Teruel) (foto inferior).



Fig.3. Representación de las zonas Españolas aptas para la producción de *Tuber melanosporum* y *Tuber aestivum* en función del tipo de suelo, ya sea silíceo, calcáreo o arcilloso (Mapa cedido por Sanchez, S. 2012).

Podemos observar en el mapa de la figura 3, que la distribución de *T. aestivum* presenta mayor superficie que *T. melanosporum*, ya que es menos restrictiva para su cultivo.

En los últimos 100 años, la producción mundial de trufa ha decaído de 2.000 a 50 toneladas al año (Callot, 1999). Esta situación puede ser consecuencia del abandono de las labores de limpieza que se realizaban en los montes. Sin olvidarnos del aumento de la población del jabalí, un mayor número de recolectores y unos efectos climatológicos desfavorables como son la disminución y mal reparto de las precipitaciones a lo largo del año y el aumento de las temperaturas (Reyna, 2007).

En estos últimos años, dada la idoneidad del territorio y las ayudas económicas aportadas por diferentes Administraciones, se está intentado suplir el descenso de la producción natural y responder a la demanda mundial de este hongo, llevando a cabo desde hace años plantaciones controladas. Esto implica un importante auge del sector trufero (De Miguel y Sáez, 2008).

En la siguiente tabla se muestran los últimos datos obtenidos en cuanto a superficie dedicada a este cultivo en nuestro país.

Tabla 1. Superficie dedicada al cultivo de trufa negra en España (ha) (J. Vilas, 2011).

SUPERFICIE ESTIMADA (ha)		
Comunidad Autónoma		Superficie plantada
ARAGÓN	HUESCA	950
	ZARAGOZA	300
	TERUEL	3.500-4.700
CASTILLA Y LEÓN		1.600
VALENCIA		950
CATALUÑA		460
CASTILLA-LA MANCHA		300
NAVARRA		300
EUSKADI		180
ANDALUCÍA		110
LA RIOJA		105
SUPERFICIE TOTAL APROXIMADA: 8.450 – 9.650 ha.		

La buena adaptabilidad de esta especie junto a los elevados beneficios que producen, alrededor de 2.700 € por hectárea y año (Oliach *et al.*, 2005), convierten a *Tuber melanosporum* en uno de los cultivos con mejores perspectivas en el mundo rural. Además contribuye a la reforestación con especies autóctonas y fomenta la diversificación agraria en zonas tradicionalmente de cereal de invierno, ya que por las condiciones del territorio, estos cultivos tienen muy poca rentabilidad (Palazón *et al.*, 1999).

1.1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los macromicetes están constituidos por dos órganos básicos: el cuerpo fructífero, que alberga las esporas con las que se propagará la especie, y el aparato vegetativo o micelio, compuesto por un conjunto de hifas, mediante el cual se nutre y se propaga por el suelo.

En el caso de las trufas, el cuerpo fructífero o **carpóforo** suele ser globoso, algo irregular, según los obstáculos encontrados durante su crecimiento. Es de tamaño variable. Lo que le hace ser fuerte y resistente es la capa protectora externa por la que está recubierto, llamada **peridio**. La parte interna de la trufa es la zona fértil, productora de esporas, conocida como **gleba**, la cual está formada por un característico entramado de venas de dos tipos: las **venas fértiles** y las **venas estériles**. Las primeras albergan el aparato esporofítico, que dará lugar a las **ascas** y **ascosporas**, cuya formación y desarrollo provoca el color de la gleba. Las venas estériles o aeríferas son de color blanquecino, sinuoso y ramificado, y se encargan de los intercambios gaseosos del joven ascocarpo con el medio externo.

Las **ascas** son globosas, albergando de 1 a 4 ascosporas. Las **ascosporas** son las esporas sexuales del hongo, son globosas y elípticas, presentando en la superficie espículas y tomando coloraciones oscuras cuando están maduras (Callot, 1999; Reyna, 2007).

Entre las diversas especies del género, unas 40 (De Miguel y Sáez, 1995), tres destacan por su carácter comercial en España. Pasamos a describir las características más importantes de las especies en las que se ha centrado el trabajo:

- *Tuber melanosporum* o trufa negra de invierno, es la más empleada en las plantaciones truferas, ya que es la que más precio alcanza en España. La podemos encontrar de Noviembre a Marzo. Su precio varía entre los 300 y 900 €/kg. [Fig. 4] Presenta un olor agradable, fuerte, muy persistente (Dessolas *et al.*, 2008).



Fig.4. Peridio, gleba y esporas de *Tuber melanosporum*.

- *Tuber aestivum* [Fig. 5], trufa de verano, se recolecta en los meses de Mayo a Septiembre, aunque puede alargarse hasta Noviembre. El precio que alcanza en el mercado es de 50-180 €/kg ya que su aroma es poco persistente (Ricard 2003).



Fig.5. Peridio, gleba y esporas de *Tuber aestivum*.

- *Tuber brumale* [Fig.6], también llamada trufa de otoño o trufa machenca. La podemos recolectar en la misma época que lo hacemos con *T. melanosporum*, lo que puede provocar confusión entre ambas. Ya que su calidad es inferior a la de la trufa de invierno, su precio también lo es, rondando los 150- 300 €/kg (Rivera 2009).



Fig.6. Peridio, gleba y esporas de *Tuber brumale*.

1.1.2 CICLO BIOLÓGICO

El hecho de que transcurra en su totalidad bajo tierra dificulta su estudio (Callot, 1999). Actualmente todavía quedan ciertas incógnitas por resolver sobre su ciclo biológico [Fig. 7], pero gracias al avance en los conocimientos sobre la genética de la especie, algunas están siendo resueltas (Riccioni *et al.*, 2008).

La simbiosis micorrícica se origina con la germinación de las esporas y con ella se inicia el ciclo vital de las trufas. Las esporas deben haber alcanzado un estado de madurez plena, adquiriendo un color pardo-oscuro, y posteriormente sufrir una serie de

transformaciones por parte del medio ambiente (humedad y temperatura favorables) antes de germinar.

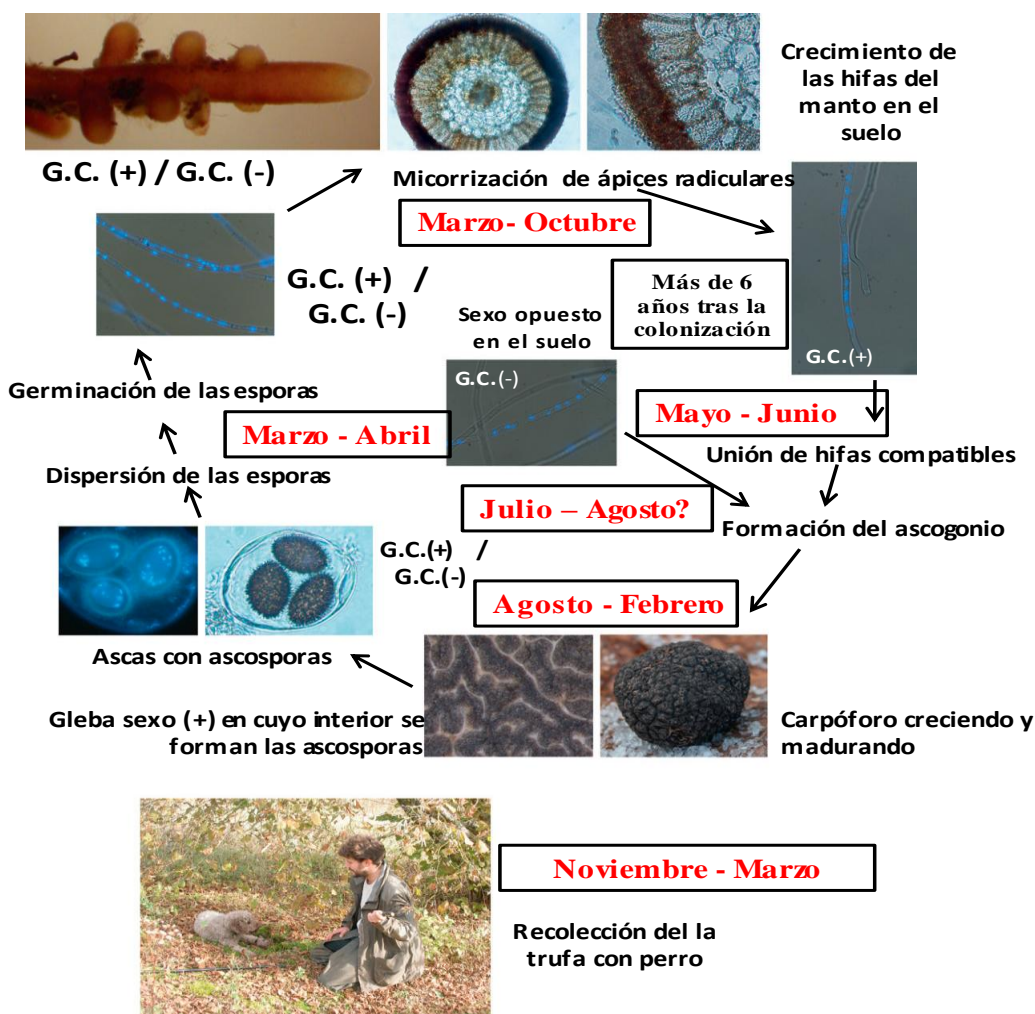


Fig.7. Ciclo biológico de *T. melanosporum* modificado de Kües y Martín (2011).

En **primavera**, la espora germina en las cercanías de la raíz de un árbol hospedador, su micelio o conjunto de hifas, crece hacia ella y la envuelve formando las micorrizas. Las hifas del micelio que parten de la micorriza, colonizan el sustrato e invaden otros ápices radicuales instaurando las micorrizas secundarias. Empieza aquí una fase que dura varios años (entre 5 y 9), en los que el hongo se limita a seguir colonizando raíces hasta que adquiere una densidad de micorrizas suficiente para comenzar a reproducirse sexualmente, es decir, a producir trufas. Durante este periodo existe un signo externo de que dicha colonización sigue su curso correctamente, que es la aparición en el terreno de una zona desprovista de vegetación alrededor del árbol que

se conoce como “quemado” [Fig. 8]. En él se produce un efecto herbicida que impide la germinación de ciertas plantas (Palazón y Barriuso, 2007).



Fig. 8. Trufera joven con quemado en torno al árbol situada en una plantación de Valbona (Teruel).

Los primordios de trufa se forman durante abril-mayo, ya que se produce la unión de hifas sexualmente compatibles. Este hecho estaba en duda hasta hace poco, ya que se suponía que la especie era homotálica, es decir se autofecundaba (Riccioni *et al.*, 2008). En la actualidad ya se pueden conocer a qué tipo sexual pertenecen ciertas micorrizas (Rubini *et al.*, 2011) e incluso se conocen los genes implicados en la compatibilidad sexual de micelios. En el mismo pie no conviven distintos tipos sexuales, ya que uno tiende a desplazar al otro, quedando todavía la incógnita por resolver de dónde procede el otro micelio necesario para que se pueda producir el cruzamiento (Rubini *et al.*, 2011).

A partir de este momento se desarrolla la trufa. En esta fase se formará el aparato esporofítico, que posteriormente dará lugar a las ascas, el peridio se cierra haciéndolo globoso y tornándose cada vez más escamoso. Durante esta fase, la trufa va engordando. Este periodo dura sobre ocho meses.

Un nuevo avance en el estudio del ciclo de la trufa, permitió demostrar que la conexión entre la trufa y el árbol dura hasta la maduración del hongo (Zeller *et al.*, 2008), a diferencia que antes se pensaba que los primordios se independizaban del ápice y comenzaban una fase denominada fase saprofítica.

En el periodo de maduración es cuando la trufa comienza a emitir distintos tipos de aromas, ya que al desarrollarse bajo tierra, las trufas necesitan la ayuda de diferentes animales (jabalíes, tejones, zorros, roedores, etc.) para diseminar sus esporas, empleando su fortísimo olor para atraerles. Ésta es la causa de que la recolección deba ser realizada con la ayuda de perros entrenados. Pero no sólo los mamíferos se ven atraídos por estos aromas, también lo hacen determinados insectos como la mosca (*Helomyza* sp.) y el escarabajo de la trufa (*Leiodes* sp.). Estudiar estos y otros artrópodos es el principal objetivo del presente trabajo.

Una vez que la trufa está madura, produce en su interior las esporas que al incorporarse de nuevo al suelo cierran el ciclo.

1.1.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA TRUFICULTURA

En España, la trufa es un recurso para zonas deprimidas. En la figura 9 se muestra la cantidad de trufa que produce cada país, nuestro país es el segundo productor del mundo pero, apenas se consumen trufas, se exportan la mayoría a Francia donde son procesadas y revalorizadas. La calidad de la trufa es muy importante, devaluándose si las condiciones no son óptimas.

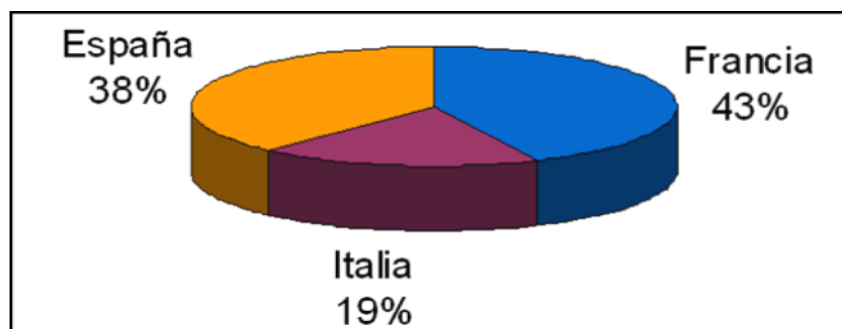


Fig.9. Producción mundial de trufa (Reyna, 2007).

La cantidad de cosecha recolectada durante la temporada depende de la disponibilidad de agua. La producción es difícil de estimar ya que se trata de un mercado oscuro.

En la figura 10 se muestra un mapa publicado por el Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, en el que se puede observar la producción española de trufa. Resulta llamativo, y es fruto del mercado poco transparente que tiene la trufa, que

la mayor producción se muestre en Soria, provincia en la que hay 1.600 ha frente a las 4.000 de la provincia de Teruel.



Fig.10. Producción de trufa por provincia Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente 2008.

La producción de trufa contribuye a la forestación ya que es una alternativa en las áreas más marginales, aumentando el valor del suelo, dándole mayor rentabilidad. Como resultado se obtiene un producto ecológico y natural, que ayuda a crear puestos de trabajo y arraiga la población al medio rural.

La intensificación del número de plantaciones estos últimos años, ha conllevado un aumento en la aparición de problemas fitopatológicos, demandando mayores servicios por parte de los investigadores para mitigar los daños originados por los parásitos tanto en las plantaciones como en post cosecha.

1.2 PRINCIPALES PARÁSITOS ASOCIADOS A CARPÓFOROS DEL GÉNERO *TUBER*

En las áreas truferas destacan distintos grupos de insectos, los cuales tienen un importante papel en la biología de la trufa. Una característica común a todos ellos es su

desarrollado sentido olfativo, el cual les permite detectar y parasitar a la trufa, tanto en fase de larva como en estado adulto. Esto produce daños irreversibles junto con pérdidas organolépticas y económicas que afectan directamente a la calidad de tan apreciado producto.

Los más destacados o conocidos en el mundo de la truficultura, son los pequeños escarabajos leiódidos (Coleoptera: *Leiodidae*) y las comúnmente denominadas “moscas de la trufa” las cuales pertenecen a 8 especies del género *Helomyza* (Diptera: *Helomyzae*) (sin. *Suilla*) (Coutin, 1972; Paccioni y Lalli 1990; Oliver *et al* 1996; Callot, 1999). En todos los manuales y guías de truficultura encontramos referencias respecto a la “caza de trufas con mosca” (Verlhac, 1990; Sourzat, 1994; Callot, 1999; Reyna 2000, 2010; Ian *et al* 2007).

La plaga que más daño causa a la trufa negra [Fig.11] es un coleóptero micófago adaptado a las bajas temperaturas (Paccioni y Lalli, 1990) llamado *Leiodes cinnamomea* (sin. *Liodes cinnamomea*) también conocido como el escarabajo de la trufa. Tiene una generación por año y tanto las larvas como los adultos causan graves daños en los distintos ejemplares de trufa. Alessandrina Arzone en 1971 realiza el primer estudio descriptivo sobre esta plaga y Harrington *et al.*, (2005), hacen una completísima revisión sobre la evolución y la ecología de los coleópteros micófagos. Son los investigadores húngaros Bratek *et al.*, (2001) los que presentan el primer artículo en el Congreso de Aix en Provence en 1999 sobre los escarabajos y moscas que se alimentan de hongos hipogeos.

En el tratado sobre los insectos que se alimentan de hongos, tanto epigeos como hipogeos, escrito por Coutin en 1972, se hace una revisión de todos los órdenes y familias de insectos pero no se describe a la especie de *Leiodes* anteriormente mencionada.



Fig.11. Ejemplar parasitado de *Tuber melanosporum*. Se aprecian diversas galerías.

1.2.1 CAUSAS DEL OLOR DE LA TRUFA Y DEL PORQUÉ SE VEN ATRAÍDOS DIFERENTES ARTRÓPODOS

La trufa al ser un hongo hipogeo necesita aflorar del suelo para diseminar sus esporas, al contrario de los hongos que fructifican en superficie, que usan la diseminación anemócora. Debido al intenso y persistente aroma que emana la trufa cuando alcanza la madurez, cientos de animales se ven atraídos hacia ella, llegando a extraerla del suelo y provocando así la diseminación zoócora.

Las sustancias volátiles que desprenden las trufas ocultas a no mucha profundidad al alcanzar la madurez, van cambiando conforme ésta evoluciona, es lo que las hace ser apetecibles. Cuando la trufa alcanza la madurez, el bosque mediterráneo no presenta otras fragancias que puedan competir con ella (Reyna, 2012).

La forma en la que utilizan el olfato los coleópteros que atacan a la trufa, sobre todo las hembras, viene descrita por Hochberg *et al.*, (2003). En dicho artículo hace referencia a que los escarabajos macho no se sienten atraídos por los olores maduros de la trufa. Son las hembras las que parasitan a la trufa, lo que sugiere que la primera en emplear una feromona para localizar trufas en distancias cortas es la hembra del escarabajo. Los escarabajos macho son atraídos por las trufas parasitadas sólo en presencia de las hembras. En contraste, los escarabajos hembra no muestran atracción

hacia la trufa infectada, lo que sugiere que emplean otras señales, posiblemente vinculadas a los olores emitidos por la trufa antes de la etapa de madurez.

Hay una hipótesis que afirma que los compuestos volátiles que emite la trufa en su fase inmadura, son distintos a los emitidos en su madurez. Los insectos se ven atraídos fundamentalmente en la etapa inmadura mientras que los mamíferos lo hacen justo antes de la descomposición (Dessolas. *et al.*, 2008).

Las señales químicas son a menudo, para la mayoría de los animales, más importantes que las visuales y auditivas a la hora de hacer una valoración sobre su entorno ambiental. Los artrópodos, tienen una fuerte dependencia de los estímulos olfativos y gustativos. Los insectos se comunican principalmente a través de comunicación química, especialmente entre los de la misma especie (Gullan y Cranston, 2000). Las antenas son las estructuras sensoriales más externas, que se implican para la detección de muchos estímulos ambientales, en particular para los que tienen limitado el empleo de la vista (Sánchez Osorio, 2005).

Los mensajes químicos que hacen que se orienten los insectos son los llamados semioquímicos, cuyas funciones vienen definidas por los términos feromonas, alomonas, kairomonas y sinomonas (Gullan y Cranston, 2000).

En la mayor parte de las ocasiones, como sucede en el caso de las trufas, son producto de estrechas coevoluciones.

1.2.2 CÓMO ACTÚAN LOS ARTRÓPODOS EN LA DISEMINACIÓN DE ESPORAS

Los artrópodos juegan un papel fundamental en la dispersión de esporas, concretamente los insectos. Los insectos son los artrópodos más abundantes de la tierra y han adoptado modos de vida muy variados. Al ser los únicos invertebrados capaces de tener un vuelo activo, junto a su pequeño tamaño y su cutícula impermeable, les ha permitido colonizar una enorme serie de hábitats, que en el caso de la trufa, contribuyen a la dispersión de las esporas, ya que en la práctica es muy difícil que la trufa logre expandir sus esporas sin la ayuda de un agente externo.

Desde comienzos del mes de diciembre hasta principios de primavera, podemos encontrar trufas maduras, de forma que las esporas ya están viables para germinar, así que la trufa emite fuertes olores según el grado de madurez para atraer a numerosos insectos, a otros invertebrados y a todo tipo de vertebrados (jabalí, roedores, zorros, tejones, etc.). Algunos tienen una vinculación específica con la trufa.

Los dípteros causan daños directos e indirectos, siendo una de las principales plagas del cultivo de *Tuber*. La mosca de la trufa o “mosca de ojos rojos” (*Suilla tuberivora*, sin. *S. gigantea* sin. *Helomyza tuberivora*) es un fiel indicador de la presencia de dicho hongo en el suelo. Viven bajo tierra, en las cavidades del ascocarpo, y están dotados de un excelente y fino olfato. (García *et al.*, 2004).



Fig.12. *Helomyza tuberivora* también conocida como mosca de la trufa, con esporas adheridas en las patas, lo que es indicador de la dispersión de esporas.

Las moscas de la trufa [Fig.12] podrían contribuir activamente a la dispersión de las esporas, ya que los adultos hacen la puesta en las trufas maduras de forma que las esporas se quedan adheridas en las pilosidades de los individuos adultos (Reyna, 2000). Sus larvas [Fig.13] se desarrollan y se alimentan en el interior de forma que contribuyen a la putrefacción del carpóforo con las galerías alimentarias que construyen.

Entre las sustancias volátiles que emite la trufa cuando alcanza la madurez, encontramos una muy similar a las feromonas sexuales del jabalí macho, lo que hace que el jabalí hembra busque trufas (Delmas, 1987). De esta forma, puede transportar a otros lugares pequeñas porciones de trufa.



Fig.13. Larva de díptero con esporas de *Tuber* tanto en el interior como adheridas en la parte externa.

Estos animales son indispensables en el ciclo de la trufa. No sólo hay que verlos como animales que devalúan el valor comercial de nuestro producto sino como dispersores naturales de las esporas, fundamentales para la producción de trufa (Vignozzi y De Rogatis, 1990; Trappe *et al.*, 2001).

En la actualidad, en la mayoría de los artículos referidos a la trufa se nombra de manera muy poco profunda algunos de los parásitos encontrados en las diferentes plantaciones truferas (Coutin, 1972; Verlhac, 1990; Sourzat, 1994; Callot, 1999; Ian *et al* 2007; Reyna, 2000; 2007, 2012). Por eso es necesario seguir avanzando en este campo, ya que los artrópodos juegan un papel fundamental en la biología de la trufera, siempre que se encuentren dentro de un equilibrio.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Carrera es obtener información sobre los distintos tipos de artrópodos parásitos que afectan a la trufa, que provocan una pérdida de calidad y por consiguiente una disminución de su valor económico en el mercado.

Los objetivos específicos son:

1. Identificación de poblaciones de artrópodos micófagas de las especies económicamente más importantes del género *Tuber* en España (*Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum* y *Tuber brumale*) y cuantificación de los daños que dichos artrópodos generan en los carpóforos.
2. Obtención de los ciclos biológicos completos de los parásitos más frecuentes para diseñar futuras estrategias de control.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La escasa información existente sobre los tipos de artrópodos que afectan a la trufa, llevó a la realización de diferentes experiencias “*in vivo*” con el fin de observar sus singularidades de crecimiento, comportamiento y desarrollo.

En este Trabajo se presentan los ensayos para determinar la evolución y el crecimiento de algunas de las especies de artrópodos que afectan a los ejemplares de *Tuber aestivum*, *T. melanosporum* y *T. brumale*.

Para el desarrollo de dicho Proyecto se han realizado unos seguimientos detallados y exhaustivos durante dos años, desde Junio de 2010 hasta Mayo de 2012, de distintos ejemplares parasitados. Concretamente 70 carpóforos de trufa de verano, 305 carpóforos de trufa de invierno y 6 carpóforos de *T. brumale*. Un total de 8.419,5 gramos de trufa procedentes de distintas zonas de la geografía aragonesa.

3.1 MATERIAL FÚNGICO

Los carpóforos de trufas empleados en este proyecto poseían tres características principales:

- Eran trufas evaluadas de segunda calidad, ya que los carpóforos presentaban formas irregulares con grandes hendiduras con el peridio cuarteado, heladas o se apreciaba alguna perforación en la gleba.
- Se han estudiado distintos tipos de carpóforos pertenecientes a: *T. aestivum*, *T. brumale* y *T. melanosporum*, este último se separaron los ejemplares en función de su maduración. Clasificándose en *T. melanosporum* inmadura, *T. melanosporum* de maduración media y *T. melanosporum* madura.
- Los lotes tienen distinta procedencia: Graus (Huesca), Aniés (Huesca), Sarrión (Teruel), el Toro (Castellón), Sierra del Moncayo (Zaragoza) y Valbona (Teruel).

La mayoría fueron recolectadas en truferas cultivadas, a excepción de las provenientes de Aniés que han sido recolectadas (cazadas) en truferas silvestres.

Las trufas se clasificaron por su procedencia y según su madurez. De cada uno de los lotes se han tomado datos respecto a sus características morfológicas más apreciables, así como de la intensidad del aroma.

Además se trabajó con la especie *Pleurotus ostreatus* (falsa seta de cardo) con objeto de comprobar la especificidad o polifagia de los parásitos y de conseguir completar su ciclo biológico en caso de que pudiesen actuar como hospedadores secundarios.

3.1.1 MATERIAL FÚNGICO I: *Tuber aestivum*

Se trata de 66 carpóforos de trufa de verano para el ensayo 1: Evaluación del parasitismo en carpóforos de *Tuber aestivum*.

LOTE 1. SARRIÓN 1: El primer lote procedía del municipio de Sarrión en la Comarca de El Maestrazgo, provincia de Teruel. Contenía 14 carpóforos de trufa de verano, visiblemente afectada por distintos parásitos. La duración del ensayo fue de 14 semanas. El lote contenía carpóforos de tamaño heterogéneo los cuales, presentaban una forma irregular, con oquedades y salientes. Se podían observar ejemplares incompletos con presencia de pequeñas larvas de insectos y otros parásitos. Presentaban un fuerte aroma.

LOTE 2. GRAUS 1: El segundo lote procedía del municipio de Graus, en la provincia de Huesca. Contenía 16 carpóforos de *T. aestivum*. Los ejemplares de trufa, llegaban en un tarro cerrado, limpios y cepillados. En ellos no se apreciaba ningún tipo de parásito ni ninguna perforación causada por alguna plaga. Su estudio se realizó durante 2 semanas. Aroma de escasa intensidad.

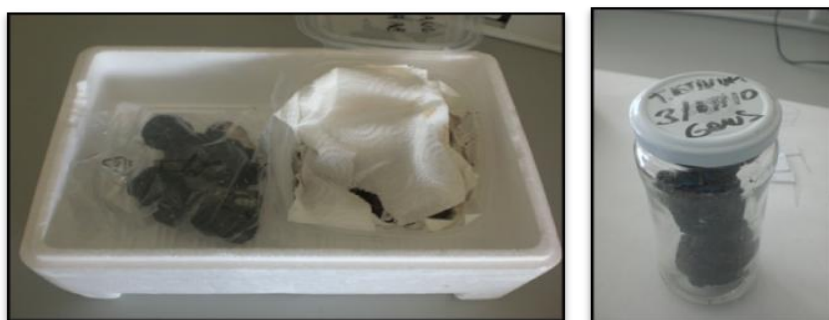


Fig. 14. Lotes de *Tuber aestivum*, el de la derecha al estar cerrado herméticamente se produjo la muerte de las larvas por asfixia.

LOTE 3. GRAUS 2: El tercer lote también era originario del municipio de Graus. Contenía 36 carpóforos de *Tuber aestivum*, en los que se apreciaba parasitismo.

Su estudio se llevó a cabo durante 16 semanas entre el 20 de Julio y hasta el 22 de Octubre del 2010. El tamaño de los carpóforos fue heterogéneo y su aroma suave.

3.1.2 MATERIAL FÚNGICO II: *Tuber melanosporum*

Se colocaron a evolucionar 30 carpóforos de trufa negra utilizados para el ensayo 2: Evaluación del parasitismo en carpóforos de *Tuber melanosporum*.

LOTE 4. ANIÉS 1: El cuarto lote procedía del municipio de Aniés, en la provincia de Huesca. Contenía 26 carpóforos de *Tuber melanosporum*. Se apreciaban parásitos de diferentes especies en los carpóforos. Las trufas eran de tamaño heterogéneo, presentando las de mayor tamaño forma aplanada. Aroma de gran intensidad. Los distintos ejemplares del lote se colocaron en los evolucionarios y su estudio se realizó durante 25 semanas desde el 18 de Noviembre del 2010 hasta el 26 de Mayo del 2011.

El material fúngico (221 carpóforos) al que se destinaron los lotes quinto, sexto y séptimo fue para realizar el ensayo 4: Evaluación del parasitismo mediante el laminado de los carpóforos pertenecientes a *Tuber melanosporum* Vittad en función del grado de madurez.

Los tres lotes provenían del municipio de Sarrión, habían sido congelados para su posterior estudio y en ellos encontrábamos carpóforos de distinto grado de madurez, los cuales fueron clasificados en tres lotes: maduras, maduración media e inmaduras atendiendo a los criterios que se explican posteriormente. El tamaño del conjunto de trufas fue heterogéneo presentando una forma muy irregular, con hendiduras y salientes. Algunos de los ejemplares estaban incompletos. Estos lotes fueron:

LOTE 5. SARRIÓN 2: El lote quinto contenía 54 carpóforos de trufa negra madura. Aroma intenso.

LOTE 6. SARRIÓN 3: El lote sexto contenía 85 carpóforos de trufa negra de maduración media. Aroma muy intenso.

LOTE 7. SARRION 4: El lote séptimo contenía 82 carpóforos de trufa negra inmadura.



Fig. 15. Lote de *Tuber melanosporum* procedente de Sarrión.

3.1.3 MATERIAL FÚNGICO III: *Tuber brumale*, *Tuber aestivum* y *Tuber melanosporum*

Las trufas pertenecientes para al ensayo 3: Evaluación del parasitismo mediante la evolución final de carpóforos pertenecientes a distintos ejemplares de *Tuber* correspondían a distintas zonas de la geografía aragonesa. Se evaluaron 6 carpóforos de *T. brumale*, 63 de *T. melanosporum* y 12 de *T. aestivum*

LOTE 8. GRAUS 3: Los ejemplares de *Tuber brumale* procedían de Graus.

LOTE 9. EL TORO 1: los carpóforos de *Tuber aestivum* pesaban un total de 80 gramos y procedían de una plantación del Toro (Castellón).

LOTE 10. VALBONA 1: El lote décimo correspondía a *Tuber aestivum* procedente del municipio turolense de Valbona.

Los lotes que se nombran a continuación correspondían todos a carpóforos de *T. melanosporum*.

LOTE 11. EL TORO 2: contenía 6 carpóforos de trufa negra correspondientes a la plantación del Toro (Castellón).

LOTE 12. MONCAYO: contenía 10 carpóforos de trufa negra.

LOTE 13. GRAUS 4: contenía un total de 20 carpóforos.

LOTE 14. SARRION 5: contenía un total de 18 carpóforos de trufas parasitadas.

3.1.4 MATERIAL FÚNGICO IV. *Pleurotus ostreatus* (Jacques Fries) Kumm

Los distintos ejemplares de *Pleurotus ostreatus* fueron adquiridos en fresco cada vez que se necesitaba. Para evitar introducir contaminaciones en los distintos ensayos se procedió a congelarlos previamente a ser usados o bien, en el caso de ser introducidos frescos, se utilizaron como testigos de parasitismo en un evolucionario diferente para ver si desarrollaban algún tipo de plaga, evitando de esta forma introducir parásitos no relacionados con *Tuber*.

Se emplearon ejemplares de *P. ostreatus* para comprobar si podían actuar como huéspedes secundarios de los parásitos del género *Tuber*. Su presencia es relativamente habitual en los bosques españoles (Sánchez, 2005) y la colonización de sus carpóforos ha sido estudiada en diferentes trabajos (Navarro. *et al.*, 2004).

Ya que otros dípteros que se han encontrado en truferas naturales, en algún momento han sido descritos como plaga de setas cultivadas (Gnaneswaran y Wijayagunesakara, 1999; Navarro *et al.*, 2004).

En la tabla 2 se puede ver el resumen sobre la procedencia de los distintos lotes de trufa que fueron empleados para los distintos ensayos, el peso, el número de carpóforos, el evolucionario donde fueron colocados y el tiempo de estudio:

Tabla 2. Características de los lotes de trufas utilizadas en este trabajo.

	LOTE	PESO FRESCO (g)	Nº CARPÓFOROS	Nº EVOLUCIONARIOS	PRESENCIA DE <i>Pleurotus</i>	DURACIÓN DEL ENSAYO
<i>T. aestivum</i>	SARRIÓN 1	334	14	3	Sí	07/07/10 al 22/11/2010
	GRAUS 1	166	16	1	Sí	07/07/10 al 20/07/2010
	GRAUS 2	1548	36	2	Sí	20/07/10 al 22/11/2010
	VALBONA 1	48	4	1	No	24/06/2011 al 30/05/2012
<i>T. melanosporum</i>	ANIÉS1	636	26	3	Sí	16/11/2010 al 01/07/2011
	ANIÉS 2	7,5	4	1	Sí	08/02/2011 al 26/05/2011
	SARRIÓN 2 Madura	1.239	54	-	-	01/05/2012
	SARRIÓN 3 Maduración media	2.054	85	-	-	15/05/2012
	SARRIÓN 4 Inmadura	1.570	82	-	-	22/05/2012
	GRAUS 4	28 179	5 15	1	No	4-25/01/2011 al 30/05/2012
	EL TORO 1	80	5	1	No	20/03/2011 al 30/05/2012
	EL TORO 2	84	6	1	No	25/11/2011 al 30/05/2012
	MONCAYO	149	10	1	No	23/11/2011 al 30/05/2012
	SARRION 5	52 105 98	4 8 6	1	No	11/12/2011 23/12/2011 15/12/2011 al 30/05/2012
<i>T. brumale</i>	GRAUS 3	42	6	1	No	01/11/2010 al 30/05/2012
<i>T. aestivum</i>		2096	70			
<i>T. melanosporum</i>		6281,5	310			
<i>T. brumale</i>		42	6			
TOTAL		8419,5	386			

LEYENDA

Ensayo 1
 Ensayo 2
 Ensayo3
 Ensayo 4

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este trabajo se llevaron a cabo 4 ensayos independientes: el primero con *Tuber aestivum*, el segundo y el cuarto con *Tuber melanosporum* y en el tercero se usaron ejemplares de *T. aestivum*, *T. melanosporum* y *T. brumale*. En todos se realizó un estudio descriptivo sobre la evolución del material empleado.

En los dos primeros ensayos tuvo lugar un conjunto de pasos que fueron comunes. Se han agrupado con el nombre de Proceso base: Recepción y colocación de los carpóforos a estudiar, el cual se comenta a continuación.

PROCESO BASE: Recepción y colocación de los carpóforos a estudiar.

- Etiquetado y pesado [Fig.16] en una balanza de precisión de los distintos carpóforos.

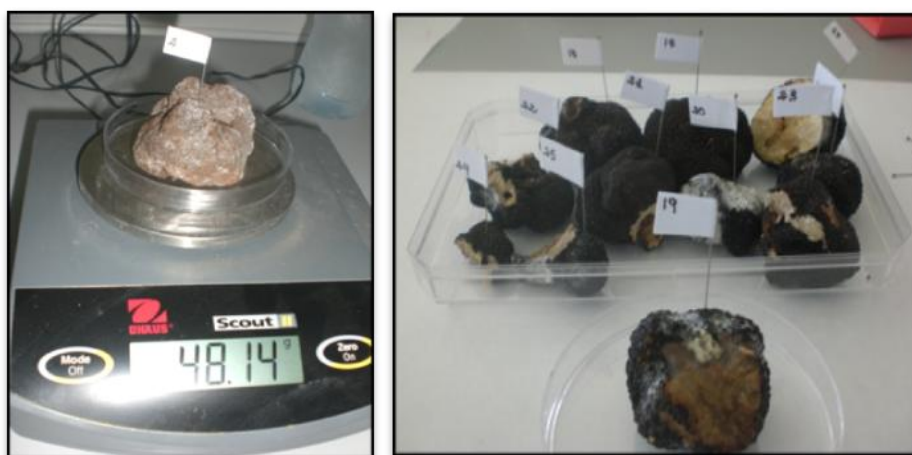


Fig. 16. Pesado y etiquetado de los carpóforos.

- Desinfección, montaje y sellado de los evolucionarios: Previamente a ser montados se desinfectaron, luego se sellaron para evitar cualquier tipo de contaminación del exterior.

- Colocación de los ejemplares en distintos recipientes: Los ejemplares se colocaron en vasos de precipitados etiquetados junto con la arena, de esta forma los parásitos, si es que alguno completaba su ciclo fuera de la trufa, podrían continuar su desarrollo. Se llenaron hasta la mitad con la arena, y se colocaron las trufas etiquetados [Fig. 17] dentro de los evolucionarios.



Fig 17. Colocación de los ejemplares de *Tuber* a evolucionar.

- Ubicación de los evolucionarios en el lugar de estudio: Para llevar a cabo el estudio, se decidió situar los evolucionarios en el sótano de la Escuela Politécnica.

Se equipó el sótano tal como aparece en la figura 18. Éstos fueron tapados con una caja de cartón, evitando de esta manera que incidiera la luz en los distintos carpóforos de *Tuber* con el fin de conseguir las condiciones normales de desarrollo en las que se encuentra la trufa en el suelo.

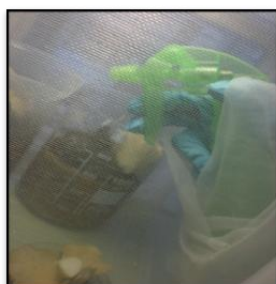


Fig 18. Aplicación de humedad mediante pulverizador y aislamiento del ensayo para evitar contaminaciones y evitar la incidencia de la luz.

- Aplicación de humedad: Se procedió a humedecer con un pulverizador que contenía agua destilada todos los recipientes. De esta forma, los ejemplares de *Tuber* estarían más húmedos, al igual que la arena, pero sin llegar a alcanzar la capacidad de campo. Esta operación se realizaba varias veces a la semana.

- Toma de datos: Se llevó a cabo la toma de datos de los distintos tipos de parásitos que iban apareciendo, así como la realización de fotografías de los mismos. A su vez, se realiza un seguimiento de las temperaturas (máxima, mínima y media) tanto del interior como del exterior de la caja. Para la identificación de los diferentes estadios se emplearon artículos específicos para cada taxon y se conservaron muestras representativas de cada uno en alcohol.



Fig 19. Ubicación de los carpóforos dentro de los evolucionarios.

3.2.1 ENSAYO 1: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE *TUBER AESTIVUM* VITTAD.

El objetivo del presente ensayo es realizar un estudio descriptivo y posterior identificación de los artrópodos parásitos hallados en la trufa de verano.

Tal como se ha comentado con anterioridad, el material fúngico que se usa para realizar este ensayo son los lotes correspondientes a SARRION 1, GRAUS 1 y GRAUS 2 y ejemplares de *Pleurotus ostreatus*, que suponen un total de 70 carpóforos de trufa de verano.

- DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

El día 7 de Julio de 2010, se reciben en el laboratorio N°12 de la Escuela Politécnica Superior 2 lotes de *Tuber aestivum*, y el 20 de Julio otro, para ser sometidos a estudio.

El procesado de las muestras se realizó de acuerdo al proceso base descrito anteriormente.

3.2.1.1 EVOLUCIÓN DE LARVAS DE COLEÓPTEROS

Al realizar el etiquetado y pesado de los distintos ejemplares de trufa, se evaluó la abundancia de larvas de parásitos [Fig. 20]. Con el propósito de observar su evolución, se procedió a aislar dos de estas larvas junto con un carpóforo de *Tuber aestivum* y arena estéril.



Fig. 20. Nicho de coleópteros dentro de *Tuber aestivum*.

Se empleó un recipiente transparente para poder observar los movimientos de las larvas en torno al ejemplar de la trufa, así como para detectar posibles galerías en la arena. Se les aplicó humedad y el recipiente se cubrió con una malla blanca [Fig. 21].



Fig 21. Estudio de las larvas de coleóptero.

3.2.1.2 COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE LARVAS Y AISLAMIENTO DE LAS MISMAS

Transcurrida una semana, ante la aparente ausencia de parásitos desde el inicio del experimento, se procedió a llevar a capacidad de campo los distintos recipientes de los evolucionarios durante un tiempo inferior a 10 segundos para comprobar si salían a flote las larvas observadas el día de la puesta del ensayo.

Una vez humedecido cada recipiente, se colocó arena hasta eliminar el exceso de agua, evitando que los parásitos murieran por asfixia.

Transcurridos 8 días desde el inicio del estudio se observó que los distintos ejemplares de larvas, saltaban de los recipientes, quedando en el suelo del evolucionario sin tener nada de lo que alimentarse. Para evitar su muerte, se procedió a:

- Añadir arena a los evolucionarios de forma que los ejemplares de *Tuber* quedaron cubiertos.
- Cerrar con una tela los distintos tipos de recipientes que contenían los ensayos. De esta forma, las larvas no abandonarían los recipientes, y la tela al ser porosa,

permitiría pasar el agua cuando se humedeciera los recipientes donde se encontraban los ejemplares.

3.2.1.3 COLOCACIÓN DE *PLEUROTUS OSTREATUS* EN EL ENSAYO

A los 10 días, se colocaron en todos los evolucionarios ejemplares de *P. ostreatus* [Fig. 22], que previamente habían sido congelados para evitar introducir cualquier tipo de plaga ajena a nuestro estudio que pudieran contener de forma adicional.

El objetivo de la introducción de *P. ostreatus* en los evolucionarios era que sirviera de alimento a los distintos parásitos que pudiera contener la trufa y favorecer así la finalización de su ciclo, en el caso de que lo hicieran fuera de la trufa.



Fig 22. Ejemplares de *Pleurotus ostreatus* que sirven de alimento a los parásitos asociados al género *Tuber*.

El objetivo de aislar los ejemplares frescos de *P. ostreatus* en un evolucionario aparte [Fig. 23], permitía descartar cualquier tipo de parásito introducido por *P. ostreatus* que para nosotros sería una contaminación. En las distintas pruebas que se hicieron nunca se desarrolló ninguna plaga.

Los ejemplares de seta de ostra se ubicaron:

- En cada recipiente que contenía ejemplares de *Tuber*.
- En el suelo de cada evolucionario, usando como soporte una placa Petri.
De esta forma se intentaba facilitar la limpieza del evolucionario.
- Se introdujeron *P. ostreatus* descongelados cada vez que se observó que los anteriores estaban secos.



Fig 23. Colocación de ejemplares frescos de *Pleurotus ostreatus* para ver si desarrollaban algún tipo de plagas por ellos solos. Sin la presencia de los carpóforos.

3.2.1.4 COMPROBACIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Megaselia* sp.

Transcurridas 12 semanas, se procedió a colocar 3 ejemplares de *Megaselia* sp. con varios ejemplares de *P. ostreatus* y un ejemplar de *T. aestivum*.

La finalidad era observar si *Megaselia* sp. era capaz de completar el ciclo biológico con la presencia de setas de ostra frescas.



Fig. 24. Colocación del ensayo. **Fig. 25.** *Megaselia* sp. junto los *Pleurotus ostreatus*. **Fig 26.** *Megaselia* sp

3.2.2 ENSAYO 2: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE *TUBER MELANOSPORUM* VITTAD.

El objetivo de este ensayo fue identificar los distintos tipos de artrópodos parásitos que afectan a los carpóforos de *Tuber melanosporum*.

El material fúngico empleado para realizar dicho ensayo fueron trufas pertenecientes a los lotes ANIÉS 1, ANIÉS 2 y ejemplares de *Pleurotus ostreatus*.

- DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

El 16 de Noviembre del 2010, se llevaron a estudio en el laboratorio N°12 de la Escuela Politécnica Superior, dos lotes de *T. melanosporum*, procedentes del municipio de Aniés (Huesca). Se trataba de trufa muy parasitada procedente de truferas silvestres.

Para evitar la introducción de plagas ajenas en los evolucionarios, se procedió al sellado de los mismos con parafilm. Se colocaron en un lugar donde no incidía la luz. Al lado del ensayo, se colocó una estufa con termorregulador para mantener las condiciones de temperatura lo más similares posibles a su ambiente natural, intentando que la temperatura no bajara de 10°C. [Fig.27].



Fig. 27. Ubicación del ensayo en el laboratorio.

Los procesos para llevar a cabo el *ensayo 2* correspondiente a *Tuber melanosporum* fueron similares a los usados en el **PROCESO BASE: Recepción y colocación de los carpóforos a estudio** empleado para *Tuber aestivum*.

3.2.2.1 COMPROBACIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *LYCORIELLA* SP. Y DE *HELOMYZA TUBERIVORA*

Transcurridas 3 semanas desde el inicio de este ensayo, se procedió a colocar en un evolucionario aislado 3 ejemplares de *Megaselia* sp. y una semana más tarde, se ubicaron tres ejemplares de *Helomyza tuberivora* en otro evolucionario.

La finalidad era observar si *Lycoriella* sp. y *Helomyza tuberivora* eran capaces de completar el ciclo con la presencia de un ejemplar de *Tuber melanosporum* y varios ejemplares de *Pleurotus ostreatus*.

3.2.3 ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE LA EVOLUCIÓN FINAL DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A DISTINTOS EJEMPLARES DE *TUBER*.

El objetivo del presente ensayo consiste en clasificar y contabilizar los distintos ejemplares de artrópodos que han evolucionado a partir de distintos tipos de carpóforos parasitados.

El material fúngico empleado fueron los carpóforos pertenecientes a *Tuber brumale* que procedían del lote GRAUS 3, *Tuber aestivum* de VALBONA 1 (Teruel) y de una plantación EL TORO 1 (Castellón). Por último, los carpóforos de *Tuber melanosporum*: GRAUS 4, SARRIÓN 5, MONCAYO 1, y EL TORO 2.

- DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Conforme se recibieron los distintos lotes de carpóforos se colocaron a evolucionar directamente en recipientes con arena esterilizada. El material se instaló en distintos evolucionarios y, a diferencia de ensayos anteriores, a estos últimos no se les aplicaba alimento ni humedad.

El material permaneció sin alterar hasta que se dio por concluido el ensayo el 30 de mayo del 2012 momento en que se procedió a contabilizar el número de adultos que habían salido a la superficie. También se observó a la lupa toda la arena en la que se habían colocado los distintos ejemplares de *Tuber*, de forma que se pudieron contabilizar los estadios de larva, pupa y adulto de los distintos parásitos que surgieron durante la evolución.

3.2.4 ENSAYO 4: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE EL LAMINADO DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A *TUBER MELANOSPORUM* VITTAD EN FUNCIÓN DEL GRADO DE MADUREZ

El objetivo del presente ensayo consiste en evaluar y determinar el grado de parasitismo que afecta a las trufas tanto en el peridio como en la gleba.

El material fúngico empleado para la realización del mismo lo componen las trufas de los siguientes lotes: SARRION 2, SARRIÓN 3 Y SARRIÓN 4.

- **DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO**

A partir de trufas frescas, reservadas en el congelador, se procedió a laminarlas para poder evaluar el número de galerías y de daños producidos por distintos parásitos en los ejemplares, empleando el siguiente método:

- Pesado: Se pesó cada carpóforo por separado, obteniendo de esta forma su peso fresco.
- Clasificación en lotes: se clasificaron las trufas en tres lotes, atendiendo a maduras, maduración media e inmaduras. Para clasificarlas, se tomaba una pequeña muestra de la gleba, se colocaba en un portaobjetos con unas gotas de agua y un cubreobjetos encima. Se observaba al microscopio a 200 aumentos y se contaba el número de ascas maduras o viables (de color oscuro), en relación con las inmaduras o inviables (de color claro), cuando aparecía el 30% maduras frente al 70 % inmaduras o viceversa, se consideraban de maduración media. La evaluación se hacía sobre un número aproximado de 100 ascas (Incausa, 2001) [Fig. 28,29,30].

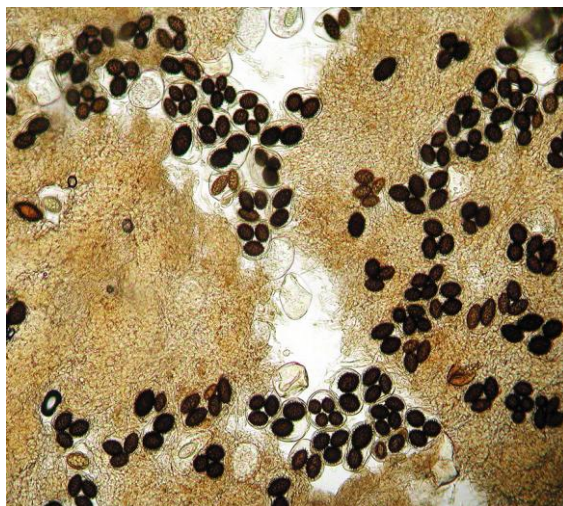


Fig 28. Vista al microscopio de ascas y ascosporas de *Tuber melanosporum* en su mayoría maduras.

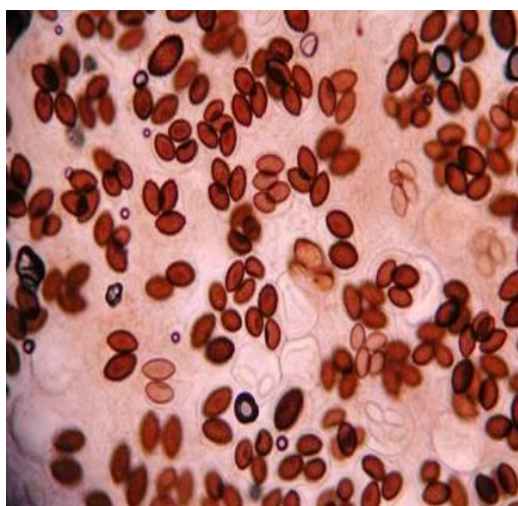


Fig.29. Vistas al microscopio de ascas de maduración media.

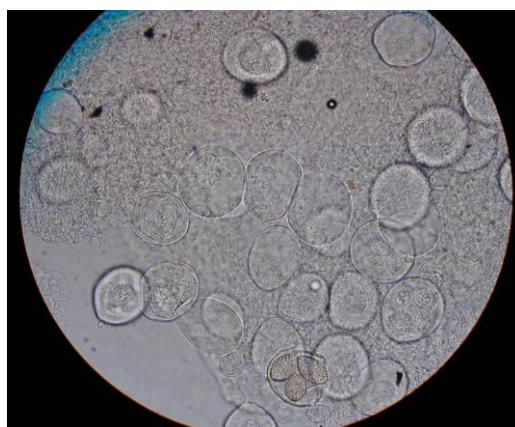


Fig 30. Vista al microscopio de ascas y ascosporas inmaduras.

- Evaluación visual: Se hizo un conteo de las distintas galerías que se observaron en la parte del peridio de cada trufa y después se contabilizaron las que presentaba la gleba [Fig.31].



Fig. 31. Carpóforo de *Tuber* que presenta gran cantidad de galerías de diplopodo, coleóptero y díptero.

- Rallado: Utilizando un laminador de trufa y una bandeja de plástico como soporte, se procedió al laminado de los carpóforos. Las láminas obtenidas [Fig.32] se reparten homogéneamente por toda la superficie y se fueron observando las galerías presentes a medida que se laminaban las trufas.

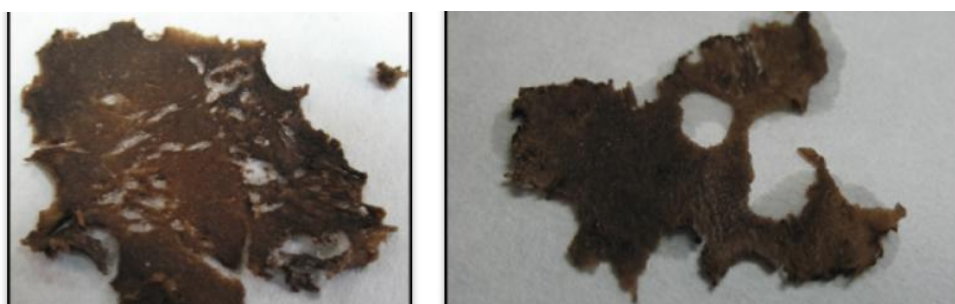


Fig. 32. Galerías producidas por coleópteros y diplopodos (izquierda) y por diplopodos (derecha).



Fig. 33. Laminado de los diferentes lotes de trufa para evaluación de daños producido por los parásitos en la gleba.

- Toma de datos: Durante la realización de este paso, se cuentan las galerías que aparecen en las láminas de los diferentes ejemplares. Se especifica el peso fresco de cada carpóforo y una evaluación del grado de parasitismo, indicando si hay galerías o no en el peridio, el número de galerías en la gleba y el tipo de parásito que las ha producido, para cada ejemplar [Fig. 33, 34].

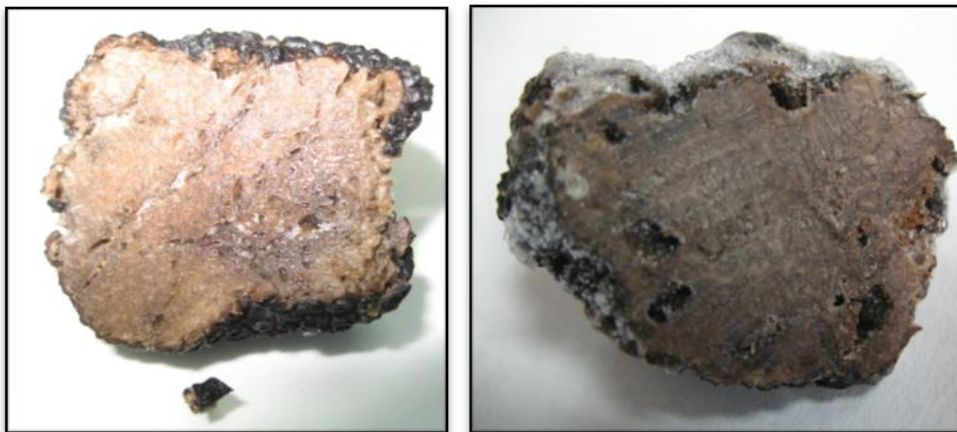


Fig. 34. Galerías producidas por coleópteros y dípteros (izquierda) y por diplopodos (derecha).

3.2.4.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Se estudió la posible dependencia de las variables cualitativas “presencia/ausencia de galerías” y “tipo de galerías” de la variable independiente “grado de madurez”, empleando la prueba chi-cuadrado y ordenando los datos de frecuencias en tablas de contingencia. Para el establecimiento de los grupos homogéneos dentro de la variable independiente se empleó la prueba chi-cuadrado entre sus categorías dos a dos.

Por otro lado cuando la variable dependiente fue cuantitativa (“número de galerías”) se comprobó su relación con la misma variable independiente “grado de madurez” mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Previamente a la realización de este análisis se comprobaron los supuestos de distribución normal de los residuos no tipificados y de homogeneidad de las varianzas, realizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov o la de Levene respectivamente. En caso de no cumplirlos se procedió a transformar la variable. Para realizar la separación de medias se empleó el test de Tukey (Guisande *et al.*, 200).

Los datos fueron analizados a través del programa SPSS, versión 15.0. y el nivel de significación empleado siempre fue del 95% (0,05).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS ARTRÓPODOS PARÁSITOS PRESENTES

Tras la identificación de los parásitos aparecidos en los 4 ensayos realizados, se obtuvieron 5 taxones diferentes como plagas de las 3 especies de trufa consideradas en el trabajo. Consiguiendo los ciclos completos de 3 dípteros. En los siguientes apartados, donde se hace referencia a los resultados individuales de cada ensayo, se pueden observar imágenes de los parásitos encontrados junto con una descripción de la evolución de los ciclos biológicos obtenidos de las 3 especies de dípteros del estudio.

La clasificación taxonómica de los distintos artrópodos parásitos hallados en los ensayos en función de la especie de *Tuber* en la que aparecieron es la siguiente:

División

Localizado

Clase *Myriapoda*

Orden *Diplopoda*

Familia *Julidae*

Género *Schizophyllum*

Especie ***Ommatoiulus sabulosus*** (sin.) *Schizophyllum sabulosu* *T. melanosporum*

División *Endopterygota*

Clase *Insecta*

Orden *Diptera*

Familia *Phoridae*

Genero ***Megaselia*** sp.

T. aestivum y *T. melanosporum*

Familia *Sciaridae*

Genero ***Lycoriella*** sp.

T. melanosporum

Familia *Helomyzidae*

Genero *Helomyza* sp.

Especie ***Helomyza tuberivora***.

T. aestivum, *T. melanosporum* y *T. brumale*

Orden *Coleóptera*

Familia *Leiodidae*

Genero *Leiodes* sp.

Especie ***Leiodes cinnamomea***.

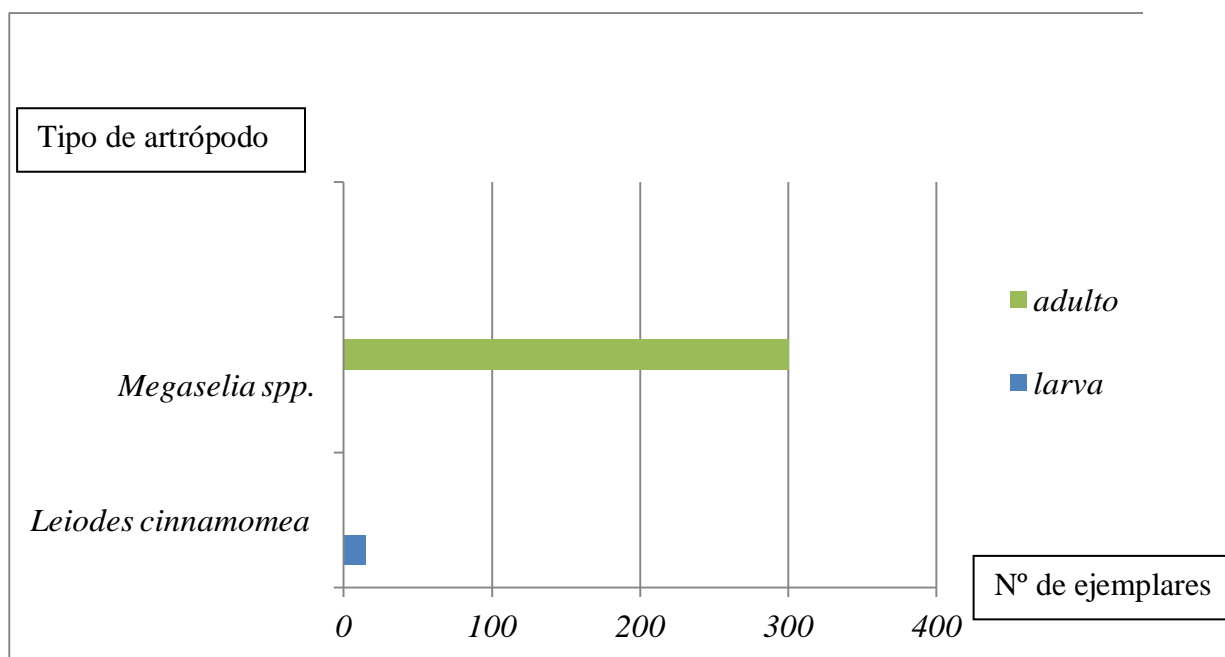
T. aestivum y *T. melanosporum*

4.2 ENSAYO 1: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE *TUBER AESTIVUM* VITTAD.

En *Tuber aestivum* se hallaron dos especies identificadas como parásitos propios de la trufa tal como indican Bratek *et al.* (2001). En la tabla 3 se muestran los parásitos encontrados: *Leiodes cinnamomea* (Panzer) y *Megaselia* sp. (Meigen).

En el laboratorio se logró completar el ciclo biológico de *Megaselia* sp.. en su totalidad sobre *T. aestivum* y *Pleurotus*.

Tabla 3. Número de parásitos evaluados visualmente en distintas fases, localizados en *Tuber aestivum*.



Durante la realización de este ensayo, tal como se muestra en la tabla 2, se observó que *Megaselia* sp. completó el ciclo repetidas veces, obteniéndose una cantidad aproximada de 300 adultos.

4.2.1 EVOLUCIÓN DE LAS LARVAS ENCONTRADAS

Transcurrida una semana desde el comienzo del estudio, se decidió llevar a capacidad de campo los recipientes donde se estaba desarrollando el ensayo, con la finalidad de observar si las larvas salían a la superficie, ya que no se apreciaba visualmente ningún estadio larvario.

Como se muestra en la figura 35, el riego permitió que las larvas observadas el primer día afloraran a la superficie, comprobando que estaban vivas.



Fig.35. Evaluación de la presencia de larvas vivas en el ensayo.

Ante la abundancia de larvas observadas, se procedió a aislar dos ejemplares de coleóptero junto con un ejemplar de *T. aestivum*. El propósito era intentar desarrollar el ciclo biológico completo del escarabajo sobre la trufa de verano, ya que *Leiodes cinnamomea* 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). Esta asociación únicamente se haya mencionada en un trabajo sobre las moscas y escarabajos que afectan a la trufa (Bratek *et al.*, 2001), en el cual se encontró una incidencia mucho menor que la observada en el presente estudio. A la vista de estos resultados parece que *L. cinnamomea* es más capaz de parasitar trufa de verano en nuestras condiciones que en las que se desarrolló dicho trabajo, ya que los estudios se realizaron en países diferentes.

Al evaluar el número de parásitos que aparecieron inicialmente en los lotes de trufa de verano, se apreciaron gran cantidad de larvas de dípteros y coleópteros, pero nunca se manifestó la presencia de adultos de *L. cinnamomea* (Browne y Scholtz 1995) tal como se muestra en la tabla 3.

Las larvas de *Leiodes* sp. aisladas en presencia de *T. aestivum* y *P. ostreatus*, nunca se llegaron a desarrollar, puesto que no se llega a observar adultos a la finalización del ensayo. Este ensayo se dio por terminado ante la imposibilidad de adquirir en el mercado ejemplares frescos de trufa de verano, al haber concluido la temporada de recolección. Sin embargo, la seta de ostra no parece ser un huésped secundario de este parásito, ya que en el microscopio se observó la ausencia de galerías en los carpóforos, por lo que las larvas no se alimentaron de éstos durante su convivencia en el evolucionario.

Para evaluar si la presencia de *Leiodes* sp. afectó también a la gleba, se procedió a laminar los carpóforos pertenecientes al lote 2, debido a que éstos fueron entregados en un recipiente cerrado herméticamente y las larvas habían muerto por asfixia.

Como muestra la figura 36, se comprobó la incidencia de *Leiodes* sp. en distintas láminas de *T. aestivum* generando galerías que devalúan enormemente el producto.

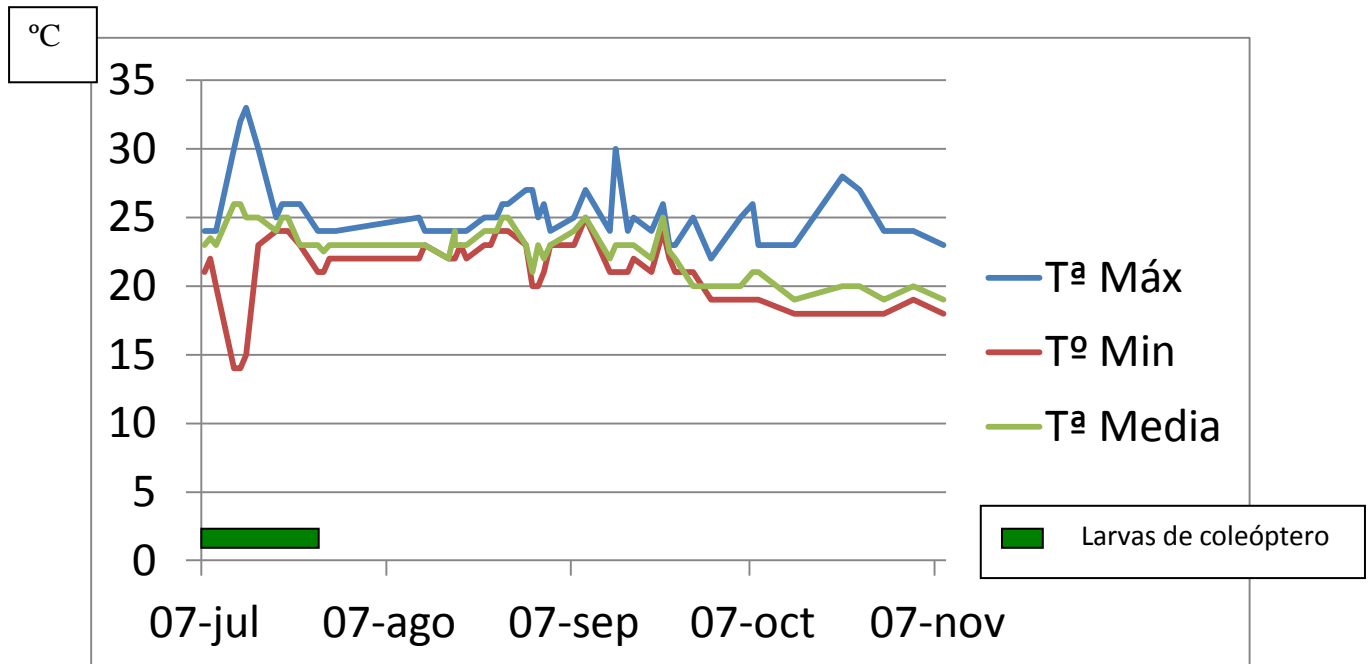


Fig 36. Láminas de *Tuber aestivum* parasitadas por *Leiodes cinnamomea*.

Durante las dos primeras semanas de este ensayo, se observaron 8 larvas de coleóptero, las cuales devoraban la parte interna de los carpóforos. La temperatura registrada fue elevada [Tabla. 4.], por lo que no lograron evolucionar a adultos, ya que las larvas de los coleópteros presentan su desarrollo en tres etapas, tras las cuales entran en diapausa, coincidiendo con el verano, para pasar a estadio ninfa en otoño,

necesitando temperaturas bajas, para lograr llegar a adultos. Los coleópteros presentan una generación anual (Arzione, 1971).

Tabla 4. Relación de las temperaturas junto con la evaluación visual de la presencia de larvas de coleóptero en el ensayo.



4.2.2 OBTENCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *MEGASELIA* SP.

El 12 de Agosto del 2010, transcurridas cinco semanas desde el comienzo del ensayo, aparece la plaga *Megaselia* sp. desarrollada sobre los carpóforos de trufa de verano.

La identificación se llevó a cabo mediante la observación morfológica de los distintos estadios (larva, pupa y adulto). Para ello se emplearon los trabajos de (Gnaneswaran, Wijayagunesakara, 1999; Henry y Withers, 2011; Miranda *et al.*, 2011).

Se observó que dicha mosca hace la puesta en los ejemplares de *Pleurotus ostreatus*. Los **huevos** son alargados, lisos y cóncavos, volviéndose translúcidos cuando están fértiles. Acorde con la densidad parental, para evitar la competencia entre larvas,

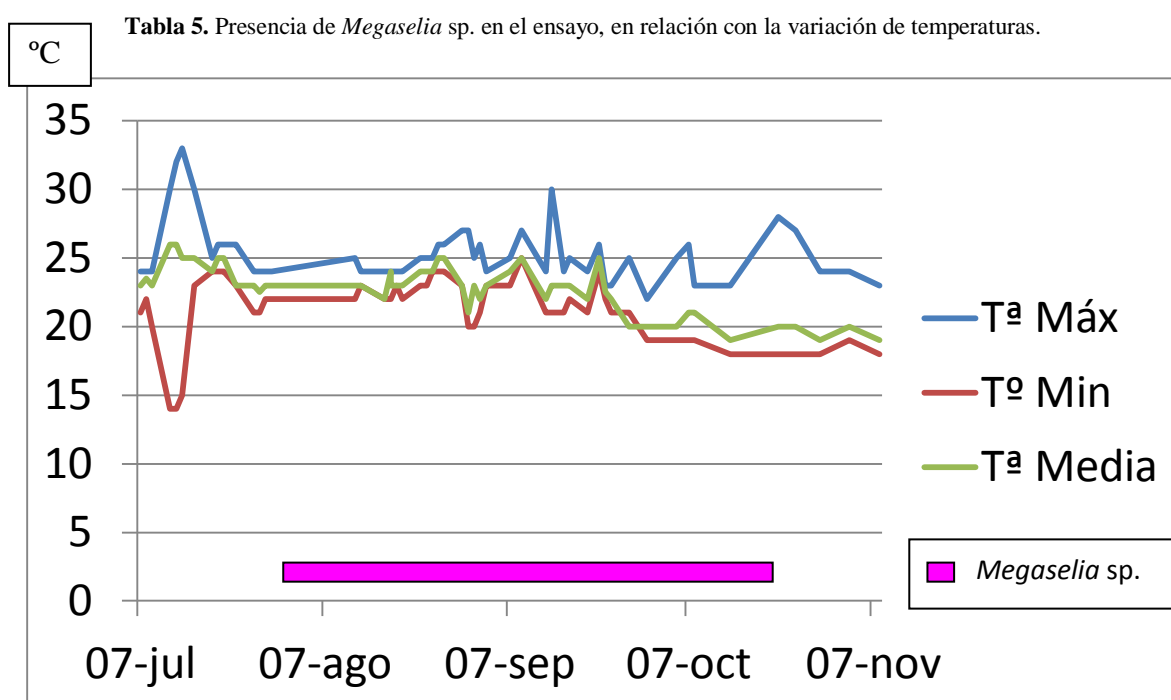
se comprobó que a mayor población de fóridos adultos obteníamos menor número de huevos por hembra.

Las **larvas** [Tabla 6] son segmentadas, de color amarillo translúcido. Se alimentaban de los ejemplares de *P. ostreatus*, parasitando primero los lugares más externos de la seta y posteriormente los más interiores, creando gran cantidad de galerías, de forma que nunca les falta el alimento. Las larvas salían de los recipientes en el momento de evolucionar al estadio de pupa.

Las **pupas** [Tabla 6] presentan un tamaño de unos 2 mm. Son amarillas, adquiriendo la tonalidad marrón cuando ya están maduras, en el momento cercano a la eclosión. Se puede observar el individuo en desarrollo en el interior.

El ciclo se completa con la aparición de los adultos. Los **adultos** alcanzan un tamaño cercano a los 3 mm. Los machos son los primeros en aparecer, mientras que las hembras tardan unos cuantos días más. Cuando éstas emergen, necesitan un período de precópula para que sus huevos maduren y se vuelvan atractivas hacia los machos. Las hembras son fotoselectivas.

La presencia de *Megaselia* sp. en el ensayo duró desde el 12 de agosto de 2010 hasta el 3 de Noviembre de 2010, tal como se observa en la tabla 5, junto con la variación de temperaturas en el ensayo.




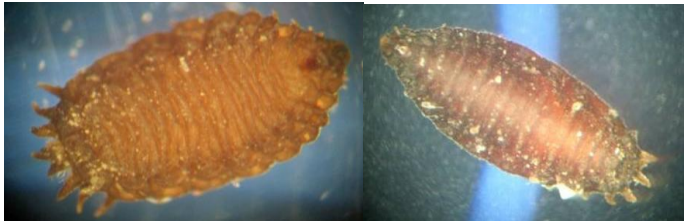



La densidad de fóridos observada no fue siempre la misma. Se observó que *Megaselia* sp. aparece en los evolucionarios en mayor densidad en las semanas cuarta, quinta, octava y décima desde el inicio del ensayo. Esto es consecuencia de que temperaturas próximas a 24°C favorecen que se complete el ciclo en 14 días, frente a los 37 días necesarios cuando las temperaturas rondan los 18°C (Henry *et al.*, 2011). Se llegan a alcanzar poblaciones de más de 300 adultos en los evolucionarios, coincidiendo con el rango de temperaturas óptimo.

A partir de la décimocuarta semana desde el inicio del ensayo, la densidad de adultos de *Megaselia* sp. disminuyó al igual que lo hizo la temperatura [Tabla.5], quedando en los evolucionarios gran cantidad de pupas.

En la tabla 6, se muestra la comprobación del ciclo biológico de *Megaselia* sp.. junto con una breve descripción de las imágenes obtenidas en el laboratorio como justificación del ciclo biológico.

Tabla 6. Ciclo de *Megaselia* sp. obtenido en el laboratorio.

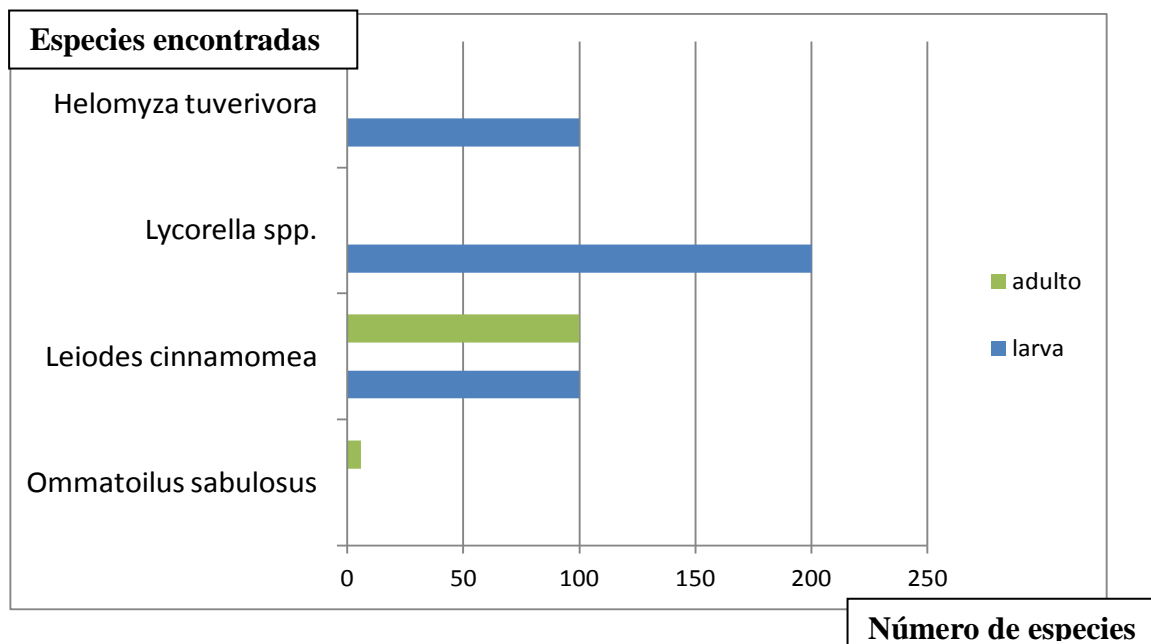
Evolución de <i>Megaselia</i> sp.	
<p>Día 0:</p> <p>Se colocan 3 ejemplares de <i>Megaselia</i> sp., una hembra y dos machos, con diversos ejemplares de <i>Pleurotus ostreatus</i>.</p> <p>Las hembras son fotoselectivas.</p>	
<p>Día 6:</p> <p>Presencia de diversas larvas en los ejemplares.</p>	
<p>Día 13: Al estar los ejemplares de <i>P. ostreatus</i> ya deshidratados, se observa que las larvas de fórido salen hacia el exterior. Para evitar esto se les proporcionan nuevos ejemplares frescos de setas de ostra.</p>	
<p>Día 21:</p> <p>Se puede observar como las larvas han pasado al estadio de pupa.</p>	
<p>Día 26:</p> <p>Aparecen nuevos ejemplares de <i>Megaselia</i> sp. volando por el evolucionario</p>	

4.3 ENSAYO 2: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO EN CARPÓFOROS DE *TUBER MELANOSPORUM* VITTAD.

En *Tuber melanosporum* se hallaron cuatro especies que se determinaron como parásitos propios de esta trufa. Tres aparecen referenciadas en el trabajo de Bratek *et al* (2001). y una, *Ommatoiulus sabulosus* (sin. *Schizophyllum sabulosum*) es una nueva referencia expresa de parasitismo en ascocarpos de *T. melanosporum*.

Como se muestra en la tabla 7, los parásitos encontrados fueron *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus), *Leiodes cinnamomea* (Panzer), *Lycoriella* sp. (Winnertz). y *Helomyza tuberivora*. Lográndose completar el ciclo biológico en su totalidad sobre *T. melanosporum* y *Pleurotus ostreatus* de *Lycoriella* sp.. (apartado 4.2.3) y *Helomyza tuberivora* (apartado 4.3.4).

Tabla 7. Número de parásitos evaluados visualmente en sus distintas fases, localizados en *Tuber melanosporum*.

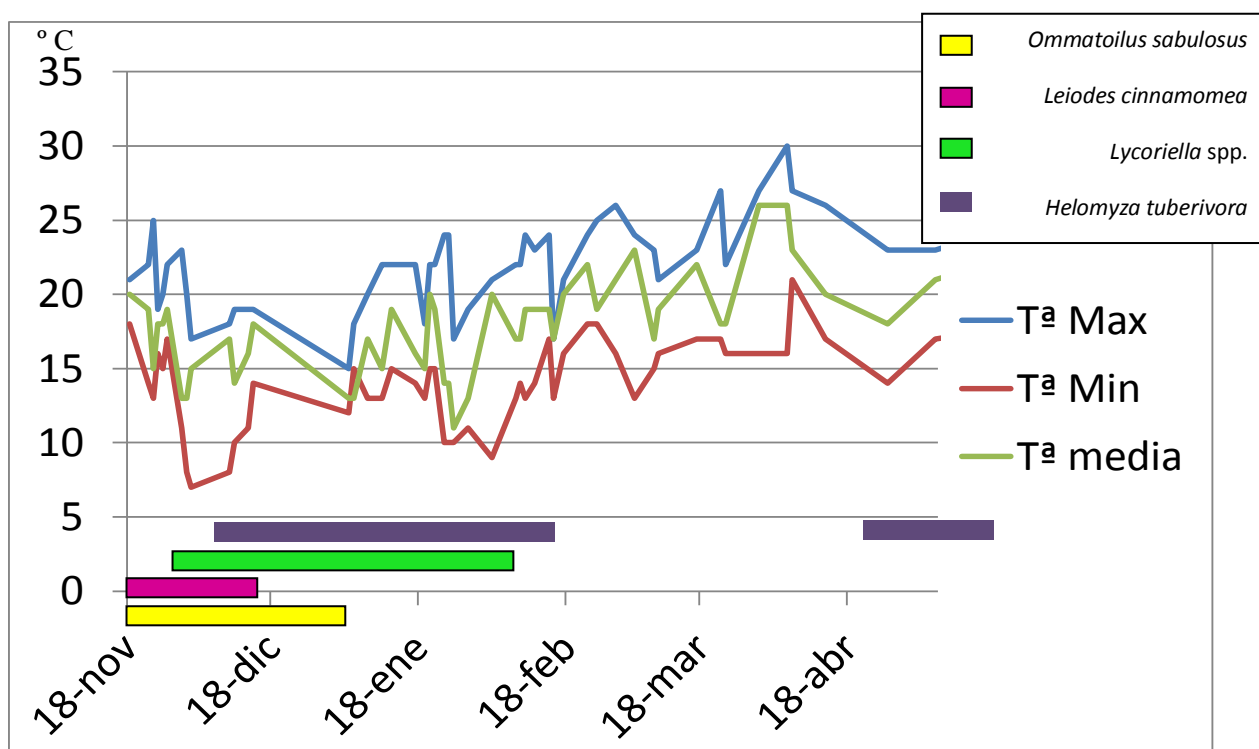


En la tabla 7 aparecen reflejados los diferentes parásitos de *T. melanosporum* y la cantidad de parásitos de cada tipo. De inicio solo hay adultos de *O. sabulosus* y de *L. cinnamomea*, mientras que hay larvas de *L. cinnamomea*, *Lycoriella* sp.. y *H. tuberivora*.

A mediados de diciembre [Tabla.8], se registraron unas temperaturas muy bajas. Con el fin de tener unas condiciones lo más similares posible a las que se encuentra la trufa en el suelo, se procedió a colocar una estufa con termorregulador produciendo una elevación de las temperaturas tal como se observa en la tabla 8.

En este ensayo se han encontrado indicios de la existencia de una posible sucesión de artrópodos que parasitan a la trufa. Las hembras de *L. cinnamomea* serían las primeras en ser atraídas por el aroma de la trufa (Harrington, 2005), mientras que *Lycoriella* sp. podría verse atraída selectivamente por el aroma de las trufas al inicio de su maduración. Conforme la trufa madura, las sustancias volátiles que emite el carpóforo maduro atraen selectivamente a *H. tuberivora*, indicador por excelencia de la presencia del hongo maduro en el suelo.

Tabla 8. Evolución de las temperaturas máxima, mínima y media junto con las especies de adultos parásitos propios de *T. melanosporum* que aparecieron durante el tiempo que duró el ensayo, colocados en orden de aparición.



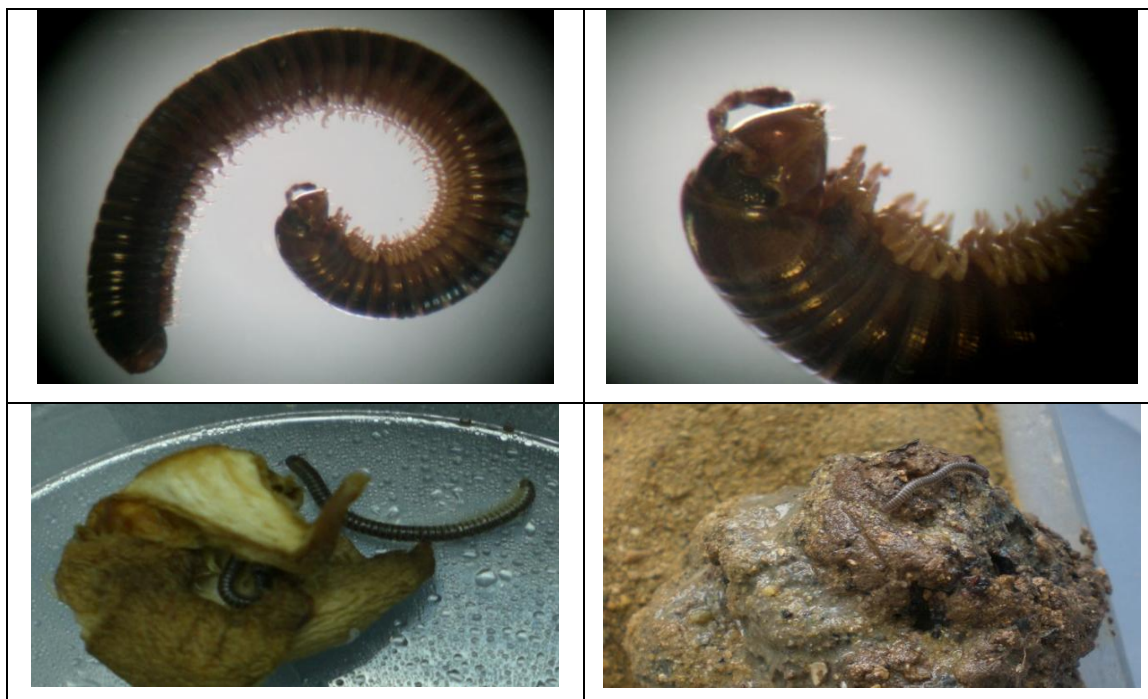
A continuación, se pasa a describir pormenorizadamente los artrópodos parásitos encontrados en *T. melanosporum* en función del orden en el que fueron apareciendo.

4.3.1 *Ommatoilus sabulosus*

Al recibir los lotes de *T. melanosporum* para ser estudiados, se observó la aparición de varios ejemplares de diplópodos (Tabla 9) (milpiés), identificados posteriormente como *Ommatoilus sabulosus* (sin. *Schizophyllum sabulosum*) (Linnaeus).

Se contabilizó la presencia de 6 diplópodos adultos (Tabla 9), los cuales parasitaban las trufas generando en los carpóforos las galerías más grandes. Estos miriápodos aprovechan los orificios creados por otros insectos micófagos para alimentarse de la trufa, provocando los mayores daños observados a lo largo de este trabajo tanto en el peridio como en la gleba.

Tabla 9. Ejemplares de *Ommatoilus sabulosus*, encontrados parasitando la trufa, su longitud alcanza los 2 cm.



No se ha encontrado ningún artículo en la revisión bibliográfica en la que asocien al milpiés como parásito de la trufa. Por lo tanto, es la primera vez que se procede a evaluar en un trabajo de investigación sobre la trufa el grado de parasitismo que produce dicho diplópodo (resultados y discusión 4.5).

4.3.2 *Leiodes cinnamomea*

Al contrario que en el ensayo de *Tuber aestivum* (4.1.1) en el que sólo se observaron larvas, en este caso se identificaron tanto larvas como adultos de coleóptero (Tabla 10). Por las características morfológicas que presentaban los distintos estadios (Arzone, 1971; Quentin, 1985), se identifica como *Leiodes cinnamomea* (Panzer). Su presencia en el ensayo tiene lugar desde el comienzo del mismo hasta mediados de diciembre (Tabla 8).

Las larvas y los imagos se encontraron en la parte interna de los carpóforos, ya que se ha podido comprobar que se alimentan de la gleba, causando daños irreparables. Son unas larvas de gran voracidad.



Las larvas de *L. cinnamomea* presentan en su desarrollo tres etapas, tras las cuales entran en diapausa coincidiendo con el verano, para pasar al estadio de ninfa en otoño.

Los adultos aparecen cuando los carpóforos de *T. menalosporum* empiezan a madurar (desde mediados de noviembre a mediados de mayo). Presentan una generación anual.



Fig.37. Larva y adulto de *Leiodes cinnamomea*. Su tamaño es de 0,5 cm.

Tabla 10. Tabla en la que aparece reflejado los distintos estadios observados de *Leiodes cinnamomea* sobre *Tuber melanosporum*.

Estadios de <i>Leiodes cinnamomea</i>	
<p>Distintas larvas de <i>L. cinnamomea</i> observadas al levantar un ejemplar de <i>T. melanosporum</i>.</p> <p>Crean sus nichos ecológicos tanto en el interior de los carpóforos como en la parte inferior de la trufa.</p>	
<p>Larva de <i>L. cinnamomea</i>. Presentan gran agresividad. Su tamaño es de 4 mm.</p>	
<p>Adulto de <i>Leiodes cinnamomea</i>, su tamaño alcanza los 0,5 cm. generando grandes galerías en los carpóforos. .</p>	

4.3.3 *Lycoriella* sp.

Desde principios de diciembre hasta mediados del mes de febrero (Tabla 11), se desarrolló la plaga identificada como *Lycoriella* sp. (Winnertz) perteneciente a la familia de los esciáridos (Diptera: Sciaridae) (Seung-gwan *et al.*, 2012).

Los esciáridos son organismos saprófagos que habitan en la naturaleza en agrupamientos de material vegetal en descomposición. Pasan el 60% del tiempo como larva y sólo un 20% en forma de pupa (Navarro, 2004). Una vez realizada la puesta, las larvas se dirigen hacia la superficie para poder pasar a pupa y evolucionar a estadios adultos.

Se logró reproducir todo el ciclo en un evolucionario aparte sobre *T. melanosporum* y *P. ostreatus*, tal como muestran las imágenes de la tabla 11. La duración del ciclo depende de la temperatura y de la cantidad de alimento (Finley *et al.*, 1984). En nuestro caso, la duración del ciclo fue de 38 días.

Tabla 11. Evolución del ciclo de *Lycoriella* sp. comprobado en el laboratorio sobre *Tuber melanosporum* y *Pleurotus ostreatus*.

Ciclo de <i>Lycoriella</i> sp.	
<p>Día 0:</p> <p>Se coloca el carpóforo de trufa negra en un evolucionario, ya que presenta gran cantidad de larvas.</p>	
<p>Día 5:</p> <p>Larva de esciárido, presenta 2 mm de longitud.</p>	
<p>Día 15:</p> <p>Las pupas tienen un tamaño aproximado de 2mm. Inicialmente son blanquecinas, pero cuando van a eclosionar adquieren una coloración más oscura.</p>	
<p>Día 38:</p> <p>Aparición de los adultos, alcanzan un tamaño de 2 mm.</p>	

4.3.4 *Helomyza tuberivora*

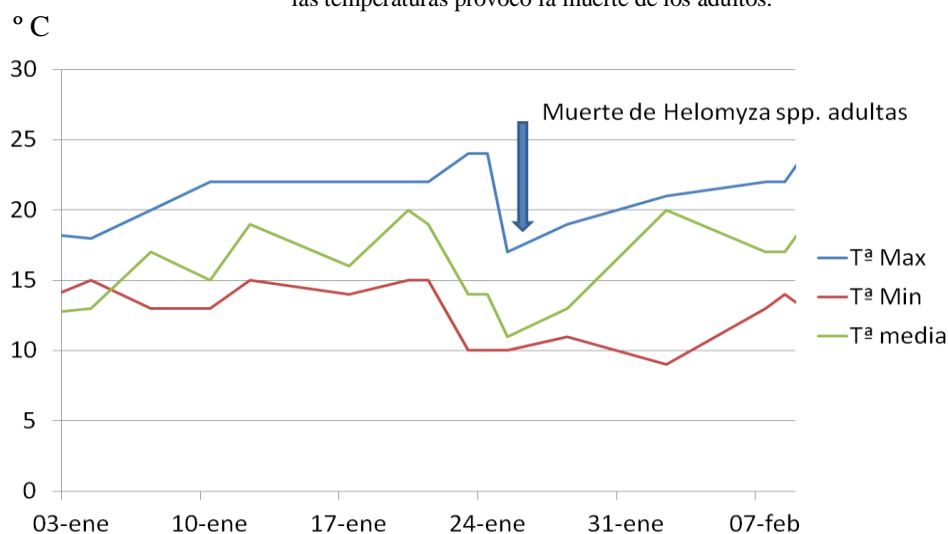
Desde principios de diciembre hasta mediados de febrero se desarrolló la plaga identificada como *Helomyza tuberivora* (Tabla 13) (antiguamente citada como *Suilla tuberivora*) (Coutin, 1972; Oliver *et al.*, 1996; Paccioni y Lalli, 1990; Callot, 1999) perteneciente a la familia Helomyzae.

En España encontramos dos especies: *Helomyza gigantea* (anteriormente *Suilla tuberivora*) y *Suilla fuscicornis* (la llamada “mosca amarilla de ojos rojos”). Ambas conocidas vulgarmente como “moscas de la trufa”. Estos dípteros están muy presentes en las áreas truferas, siendo fieles indicadores de la presencia de carpóforos en el suelo. Viven bajo tierra, en las cavidades del ascocarpo.

Es una plaga muy asociada al cultivo de la trufa, se puede encontrar en multitud de guías, ya que mediante el vuelo de los adultos se puede localizar el hongo muy maduro, lo que se conoce en truficultura como “cazar trufas a la mosca” (Callot, 1999; García *et al.*, 2004).

La duración total del ciclo depende principalmente de la temperatura, aunque también se ve afectada por la cantidad de alimento disponible. En el laboratorio se consiguió reproducir el ciclo biológico de *Helomyza tuberivora*, pero el descenso drástico de las temperaturas (14° C), como se muestra en la tabla 12, provocó la muerte de los adultos.



Tabla 12. Evolución de las temperaturas durante el ciclo biológico de *Helomyza tuberivora*. El descenso brusco de las temperaturas provocó la muerte de los adultos.



Se ha comprobado que los adultos realizan vuelos cortos, siempre guardando la vertical de la trufa. Estas moscas son muy activas durante el día, siempre y cuando las temperaturas sean cálidas.

Los adultos realizan la puesta en el suelo por encima del ascocarpo. Hay estudios que comprueban que *Helomyza tuberivora* logra parasitar trufas que se hallan en los primeros 30 cm del suelo (García *et al.*, 2004).

Tabla 13. Comprobación del ciclo de *Helomyza tuberivora* sobre *Tuber melanosporum* y *Pleurotus ostreatus*.

Ciclo de <i>Helomyza tuberivora</i>	
<p>Día 0:</p> <p>Larva de <i>Helomyza tuberivora</i>.</p> <p>Se observa el aparato digestivo repleto de ascosporas. Su longitud es de 3 mm.</p>	
<p>Día 80:</p> <p>Pupas de <i>Helomyza tuberivora</i> su tamaño alcanza los 0,5 cm.</p>	
<p>Día 180:</p> <p>Los adultos alcanzan un tamaño de 1 cm, tienen una coloración ocre, ojos rojos muy característicos, alas de color gris-azulado.</p>	

A los 5 ó 6 días de la puesta, las larvas se dirigen a parasitar la trufa, perforándola con gran voracidad. En el laboratorio se ha observado el aparato digestivo de estas larvas repleto de ascosporas.

Una vez que las larvas parasitan el ascocarpo, pasan rápidamente al estadio pupa, y cuando las condiciones son adecuadas, los adultos salen a la superficie, presentando dos generaciones al año (Granetti y Materozzi, 2005).

4.4 ENSAYO 3: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE LA EVOLUCIÓN FINAL DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A DISTINTOS EJEMPLARES DE *TUBER*.

En el presente ensayo se realizó la identificación y cuantificación de los diferentes artrópodos parásitos que afectan a la trufa. Los resultados obtenidos se agruparon por especie de trufa (Tabla 14).

4.4.1 *Tuber aestivum* Vittad

En este reconocimiento, se obtuvo como resultado la presencia conjunta de distintos estadios de dos tipos de dípteros: *Megaselia* sp. y *Helomyza tuberivora*. En cambio en el ensayo 4.1 sólo se localizó *Megaselia* sp., obteniéndose gran densidad de ejemplares, ya que se completó el ciclo biológico en sucesivas ocasiones durante el ensayo de *T. aestivum*.

4.4.2 *Tuber melanosporum* Vittad

Los resultados obtenidos para *T. melanosporum* demuestran que hay lotes en los que conviven hasta tres especies distintas, (Fig.38), representando el mayor grado de parasitismo de todos los carpóforos de *Tuber*.

El resumen de los resultados obtenidos de los 9 lotes de trufa negra que se sometieron a estudio fueron los siguientes:

- *Leiodes cinnamomea* estaba presente en 8 de los 9 lotes.
- *Helomyza tuberivora* presente en 7 de los 9 lotes.
- *Megaselia* sp..se obtuvieron muestras en 3 de los 9 lotes.
- *Lycoriella* sp. se manifestó en 1 de los 9 lotes.



Fig 38. Pupas de *Helomyza tuberivora* y *Megaselia* sp. en el mismo carpóforo (izquierda), *Helomyza tuberivora* sobre *Pleurotus ostreatus*.

4.4.3 *Tuber brumale* Vittad

Los resultados de las identificaciones obtenidas en *T. brumale* fueron en todos los casos correspondientes a *H. tuberivora*, no encontrándose ninguna fase de otros parásitos relacionados con la trufa.

H. tuberivora se ha encontrado en las 3 especies de trufas estudiadas, por lo que parece tratarse de un parásito poco específico. Además, también fue capaz de vivir sobre *P. ostreatus*. La polifagia de esta especie [Fig.38] ya había sido citada en otros artículos (Reyna, 2007).

Tabla 14. Relación cuantificada de las especies vinculadas a la trufa que han sido obtenidas en el presente ensayo.

		<i>COLEÓPTERO</i>		<i>MEGASELIA</i> sp.			<i>HELOMYZA TUBERIVORA</i>		<i>LYCORIELLA</i> sp.
Procedencia	Especie de trufa	Larva	Adulto	Larva	Pupa	Adulto	Pupa	Adulto	Adulto
VALBONA 1	<i>T. aestivum</i>	-	-	-	-	4	9	3	-
EL TORO 1	<i>T. melanosporum</i>	3	3	-	<200	-	-	-	-
GRAUS 4	<i>T. melanosporum</i>	3	-	-	<100	-	40	4	-
GRAUS 4	<i>T. melanosporum</i>	-	-	-	-	-	1	25	-
SARRIÓN 5	<i>T. melanosporum</i>	59	-	-	4	-	5	-	-
MONCAYO 1	<i>T. melanosporum</i>	3	17	5	-	-	-	1	-
GRAUS 4	<i>T. melanosporum</i>	-	2	-	-	-	-	-	-
SARRIÓN 5	<i>T. melanosporum</i>	-	2	-	-	-	2	1	7
GRAUS 4	<i>T. melanosporum</i>	-	4	-	-	-	-	1	-
EL TORO 2	<i>T. melanosporum</i>	34	-	-	-	-	2	-	-
GRAUS 3	<i>T. brumale</i>	-	-	-	-	-	-	4	-

4.5 ENSAYO 4: EVALUACIÓN DEL PARASITISMO MEDIANTE EL LAMINADO DE CARPÓFOROS PERTENECIENTES A *TUBER MELANOSPORUM* VITTAD EN FUNCIÓN DEL GRADO DE MADUREZ

El objetivo del presente ensayo consistió en evaluar y determinar el grado de parasitismo que afecta a las trufas tanto en el peridio como en la gleba, según el tipo de madurez que presente el lote de *Tuber melanosporum*. Dicho grado de parasitismo se evaluó mediante tres variables: presencia, número y tipo de galerías.

4.5.1 PRESENCIA DE GALERÍAS

Se comenzó valorando la parte externa de los carpóforos de los distintos lotes (material y métodos 2.4) y se anotó la presencia o ausencia de galerías (Tabla 15). A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis correspondiente.

Tabla 15. Tabla de contingencia que muestra las frecuencias de la presencia de galerías en función del tipo de madurez del lote de *T. melanosporum*.

GALERÍAS		Maduras	Maduración media	Inmaduras
No	N	0	9	8
	%	0%	10,6%	9,8%
Si	N	54	76	74
	%	100%	89,4%	90,2%

La presencia de galerías no depende de la maduración del lote, aunque se roza la significación estadística: $\chi^2=5,996$ y $p=0.05$, que equivale al umbral de significación. En la tabla 15 aparece reflejado que en el lote correspondiente a trufas maduras, todos los carpóforos presentan daños, que en las de maduración media está afectado el 89,4% y en las inmaduras un 90,2%.

Si estudiamos los grados de madurez haciendo una comparativa dos a dos, entre lotes, encontramos los resultados que figuran en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Resultados de la prueba de χ^2 (valor χ^2 y significación $p < 0,05$) para cada combinación dos a dos de los grados de maduración. ns: prueba no significativa.

	Valor	<i>p</i>
Lote maduras y lote maduración media	4,490 ^v	0.034 < 0,05 *
Lote maduras y lote inmaduras	3,974 ^v	0,046 < 0,05 *
Lote maduración media y lote inmaduras	0,032	0,859 > 0,05 ns

^v Se aplicó la corrección de Yates ya que alguna frecuencia esperada resultó ser < 5.

Tabla 17. Separación en grupos homogéneos de frecuencia de aparición de larvas en función del grado de madurez.

Lote maduras	100% b
Lote maduración media	89,4% a
Lote inmaduras	90,2% a

La presencia de galerías parece ser significativamente mayor en trufas maduras frente a las de maduración media e inmaduras. Sin haber diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. Este hecho puede ser consecuencia de la mayor concentración de aromas que emiten los carpóforos maduros frente a los inmaduros (Callot, 1999), lo que provoca que los parásitos se vean mayoritariamente atraídos hacia ellas.

4.5.2 NÚMERO DE GALERÍAS

Se procedió a realizar un estudio del número de galerías detectado por carpóforo. De cada ejemplar de trufa se contabilizó el número de perforaciones que presentaba (material y métodos 2.4).

Para la realización del análisis de varianza se transformó la variable mediante la raíz cuadrada para que los residuos no tipificados tuviesen una distribución normal

(prueba de Kolmogorov-Smirnov con $Z=0,957$ y $p=0,319 >0,05$) y que las varianzas fuesen homogéneas (prueba de Levene con valor= 1,564 y $p=0,212 >0,05$).

Los resultados del ANOVA realizados sobre los datos del número de galerías para cada ejemplar de cada lote se muestran en la tabla 18. En ella se observa que el número de galerías depende del grado de madurez. Siendo este significativamente mayor en las trufas maduras que en los otros dos grupos ya que éstas se encuentran más tiempo en el campo. En éstas, se obtuvo una media de 8,4 galerías por ejemplar.

Tabla 18. Número de trufas analizadas, número medio de galerías y desviación típica en función del grado de madurez de los lotes analizados. Resultados de la ANOVA (F y p) y separación de medias por el test de Tukey. Los lotes que no comparten letra tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$).

	Nº de casos	Media y p	
Inmaduras	82	5,9±4,5 a	
Maduración media	85	5,4±4,4 a	
Maduras	54	8,4±4,5 b	
H y p		7,967	0.000

4.5.3 TIPO DE GALERÍA

Al proceder al laminado de la trufa, se evaluó visualmente los distintos tipos de galerías que presentaba la gleba en función del grado de maduración. Los diámetros más pequeños pertenecían a los dípteros, los que eran un poco más grandes correspondían a coleópteros y los mayores orificios a milpiés como se muestra en la figura 39.

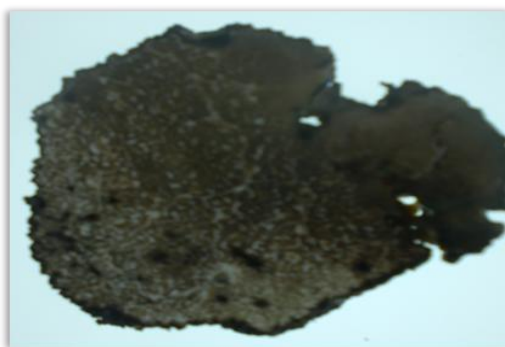


Fig. 39. Daños producidos por dípteros, coleópteros y milpiés.

Cuando se realizó el análisis de la gleba, se procedió a contabilizar el número de galerías que presentaba cada carpóforo en función del tipo de parásitos que las habían producido. Comprobando así, si la frecuencia de aparición de cada artrópodo depende de la madurez del lote. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 19.

Tabla 19. Frecuencia de aparición de daños producidos por los tres diferentes grupos de artrópodos considerados en los tres niveles de madurez de los carpóforos de *Tuber melanosporum*. Resultados de la prueba de χ^2 (valor χ^2 y significación p) para cada combinación dos a dos de los grados de maduración. ns: ausencia de diferencias significativas. Las frecuencias que no comparten letra poseen diferencias significativas entre sí; $p > 0,05$.

Grado de madurez	% Dípteros	% Coleópteros	% Miriápodos
Maduras	74,1 % ns	75,9 % b	16,7 % b
Maduración media	78,8 % ns	43,5 % a	0,0 % a
Inmaduras	74,4 % ns	34,1 % a	1,2 % a
χ^2 y p	0,598 y 0,742	23,859 y 0,000	24,529 y 0,000

• DÍPTEROS

Los resultados que se muestran en la tabla 19, nos dicen que la presencia de daños producidos por los dípteros no depende de la madurez del lote. No hay diferencias significativas entre los distintos grados de madurez.

Este hecho no quiere decir que cada grupo de dípteros no esté selectivamente ligado a ciertas fases de la maduración de los carpóforos como se observó en el ensayo 4.2. En este caso la apreciación a posteriori del total de daños de cada ejemplar no ha permitido hacer esta distinción.

• COLEÓPTEROS

La frecuencia de aparición de los coleópteros depende del grado de madurez del lote y parece ser directamente proporcional a la maduración de los carpóforos. No encontrando diferencias significativas entre los lotes maduración media e inmaduras (Tabla 19).

Las trufas maduras presentan mayor cantidad de coleópteros, confirmando el trabajo de Harrington (2005), donde se señala que esta especie es la que se encuentra con mayor frecuencia en *T. melanosporum* maduras ya que las hembras de *L. cinnamomea* se sienten más atraídas hacia la trufa por sus compuestos volátiles.

- MIRIÁPODOS

La incidencia del daño producido por los miriápodos depende de la madurez del lote. Como se muestra en la tabla 19, los carpóforos maduros son los que mayor incidencia de daños producidos por miriápodos presentan existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos y los otros dos grupos.

Ninguno de los lotes presentó daños producidos únicamente por milpiés. Durante el periodo de realización de los ensayos se pudo comprobar que el milpiés aprovecha las galerías generadas por los coleópteros agrandándolas. Por sí solo parece no ser capaz de generar galerías.

También hay que considerar que la dureza del peridio y de la gleba es mucho menor cuando el carpóforo sobremadura, lo que facilita la entrada de este tipo de parásitos oportunistas, ya que sus mandíbulas no son lo suficientemente fuertes como para perforar la trufa por sí solas creando nuevas galerías.

4.6 DAÑOS Y POSIBILIDADES DE CONTROL DE LOS DISTINTOS PARÁSITOS ENCONTRADOS EN *TUBER*

4.6.1 COLEÓPTEROS

Leiodes cinnamomea

Los daños generados, tanto por la larva como por el adulto, son cuantiosos, ya que excavan grandes galerías tanto en el peridio como en la gleba, siendo las larvas las más agresivas, provocando su voracidad las mayores pérdidas en la gleba. Por contra, los adultos provocan graves perforaciones en la parte externa de la trufa.

En el presente trabajo, se han encontrado larvas de coleóptero en ejemplares de *T. melanosporum* y *T. aestivum* a diferencia de lo que indican otros trabajos de investigación sobre coleópteros en *Tuber* (Arzone, 1971; Reyna, 2012).

CONTROL: Se han realizado diferentes estudios sobre posibles medidas de control para *Leiodes*, (Femcal, 2011) realizados por la Universidad Católica de Ávila (2011), en los que se emplea un sistema basado en el trapeo masivo con feromonas de la explotación micológica, realizado de forma ecológica y selectiva.

4.6.2 MIRIÁPODOS

Ommatoilus sabulosus

Los diplópodos se consideran plaga secundaria, ya que parasitan productos cercanos a la podredumbre y se alimentan de la vegetación en descomposición o la materia orgánica mezclada con el suelo (Crawford, 1990).

Es la primera vez que se describe esta plaga en trufa. Los daños ocasionados son galerías de gran diámetro, que provocan graves pérdidas en la gleba. Necesitan que los carpóforos se encuentren cercanos a la podredumbre, puesto que por si solos no son

capaces de crear galerías. Tal como se ha observado en este proyecto, aprovechan las galerías perforadas por los coleópteros para ampliarlas y seguir parasitando los carpóforos.

Son vectores de enfermedades, ya que en sus extremidades llevan multitud de bacterias.

CONTROL: Es conveniente la eliminación del resto de plagas que afectan a los ejemplares de *Tuber*, puesto que al ser una plaga secundaria no podrá aprovechar las galerías generadas por otros artrópodos.

Los diplópodos al carecer de una cutícula cerosa son susceptibles a la pérdida de agua, y deben pasar la mayor parte de su tiempo en ambientes húmedos o mojados, necesitando tener humedad en el terreno. Se evitará que parasiten la zona de la trufeta si se logra reducir la humedad.

4.6.3 DÍPTEROS

4.6.3.1 *Megaselia* sp.

El mayor daño causado por los fíridos tiene lugar cuando se encuentran en estadio larvario, ya que producen multitud de túneles en la gleba que generan graves deterioros en la calidad. Los adultos también se consideran dañinos porque actúan como vectores de enfermedades y de plagas.

Se necesita un gran número de larvas o de adultos para que afecten a la producción. En este ensayo se ha manifestado en *Tuber aestivum* y *Tuber melanosporum*, siendo en el primero donde mayor población ha desarrollado.

Para evitar que la población aumente en la plantación es conveniente retirar los ejemplares de trufa de verano y cualquier tipo de carpóforo, tanto epigeo como hipogeo, evitando así que *Megaselia* sp., al no tener alimento, complete el ciclo y produzca daños sobre trufa negra.

4.6.3.2 Lycoriella sp.

Los esciáridos permanecen en estadio larvario mucho más tiempo que los fóridos, es por ello que son más peligrosos. El estadio larvario es el que produce mayor daño a la parte interna de la trufa, afectando de forma importante a la calidad. Los adultos también son dañinos, ya que hacen sus puestas en las láminas y en la base de los pies de los carpóforos epigeos siendo usados por otras plagas para su dispersión (Clift y Larsson, 1987).

En el presente proyecto, se ha podido comprobar que los adultos de *Lycoriella* sp. hacen su aparición en *T. melanosporum* unas semanas antes que lo haga *Helomyza tuberivora*. Esta observación, de comprobarse con certeza, podría hacer de este parásito un indicador más fiable de la presencia en el suelo de carpóforos más cercanos al punto de maduración, que además desaparecen cuando la trufa ya se encuentra madura quedando solamente *H. tuberivora* como parásito en estas trufas. Sin embargo, el pequeño tamaño de sus adultos, comparados con los de *H. tuberivora*, limitaría su uso para la “caza con mosca”.

4.6.3.3 *Helomyza tuberivora*

La plaga causada por *Helomyza tuberivora* es la más común asociada al cultivo de la trufa, junto con la originada por *Leiodes cinnamomea*.

Los helomícidos adultos depositan sus huevos sobre el terreno donde se encuentra la trufa. La puesta, muchas veces, tiene lugar en fases avanzadas de maduración del hongo, ya que es en esos momentos, cuando éste desprende mayor aroma. Esto indica hipermaduración o incluso putrefacción del ascoma (García, 2004; Callot, 1999).

Son micetófagas estrictas, ya que sus larvas consumen el ascocarpo de la trufa, lo que provoca una rápida degradación por putrefacción enzimática de toda la gleba. Sin embargo, los adultos favorecen la dispersión de esporas, al quedar éstas adheridas a sus pilosidades. Los adultos también se usan como indicadores de la localización del hongo maduro, debido a que su tamaño es superior a 1 cm, a diferencia de las anteriormente citadas que no superaban los 0,3 cm.

Helomyza tuberivora presenta dos generaciones por año, ya que desde el mes de marzo se pueden observar adultos cerca de los árboles truferos. (Coutin, 1972). En el presente proyecto, dicho díptero se manifestó en *T. aestivum*, *T. brumale* y *T. melanosporum*, reproduciendo el ciclo sobre este último.

4.6.3.4 POSIBLES SOLUCIONES PARA EL CONTROL DE DÍPTEROS Y RESTO DE ARTRÓPODOS EN LAS TRUFERAS

A modo de reflexión, sería necesario disminuir los alimentos puente sobre la que los adultos hacen la puesta para conseguir una reducción del número de individuos en la trufera. Ello implicaría la eliminación de la plantación de las setas y carpóforos epigeos e hipogeos, que actúan como fuente de alimento y lugar de reproducción, puesto que *Megaselia* sp. y *Lycoriella* sp. son insectos polípagos.

En el caso de emplear el método usado en este proyecto, al haber obtenido los ciclos biológicos de *Megaselia* sp., *Lycoriella* sp. y *Helomyza tuberivora*, sería conveniente llevar a cabo nuevos estudios de investigación para establecer estrategias de control sobre dichos dípteros. Lo ideal sería realizar un control biológico, teniendo en cuenta que todavía no se conoce la fauna auxiliar de estos insectos.

Por otro lado sería conveniente retirar las trufas parasitadas del cultivo con el fin de reducir la población de parásitos de dípteros. Además una manera, habitual entre los recolectores, de disminuir la carga parasitaria de las trufas recolectadas es aislarlo dentro de un recipiente cerrado herméticamente durante poco tiempo, de manera que los parásitos salen de las trufas y mueren por asfixia.

Una vez recolectadas las trufas parasitadas o no, lo más conveniente sería alejarlos de la zona de cultivo o recolección para evitar un nuevo parasitismo de los carpóforos sanos, disminuyendo de esta manera las poblaciones de artrópodos dañinos en el ecosistema.

Además, si en la zona hubiera trufas de otras especies, como de *T. aestivum*, si se recolectaran, evitaríamos que los artrópodos completaran su ciclo rompiendo la cadena de alimentación.

A su vez, la refrigeración rápida de las trufas eliminarían los adultos, tal como se pudo comprobar en el caso de *Megaselia* sp y *Helomyza tuberivora*.

Para evitar poblaciones y daños excesivos de estos artrópodos resultaría útil realizar una pequeña labor de arado en las partes más superficiales del quemado, es decir la parte que comprendiera los primeros 30 cm del suelo. De esta forma se eliminarían los ejemplares de *Tuber* más someros, que son los más fáciles de parasitar.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo son las siguientes:

1. Entre las especies de *Tuber* estudiadas: *Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum* y *Tuber brumale* se detectaron 5 taxones diferentes de artrópodos parásitos, siendo 3 dípteros: *Megaselia* sp., *Lycoriella* sp. y *Helomyza tuberivora*. 1 coleóptero *Leiodes cinnamomea* y 1 miriápodo *Ommatoiulus sabulosus*.
2. Se presenta como novedad la capacidad de parasitar carpóforos de *Tuber melanosporum* de los dípteros *Megaselia* sp. y *Lycoriella* sp. de parasitar carpóforos de *Tuber melanosporum* y del miriápodo *Ommatoiulus sabulosus* como plaga secundaria.
3. El parásito de *Tuber melanosporum* más voraz es el coleóptero *Leiodes cinnamomea* que ha sido encontrado sobre carpóforos de trufa de verano (*Tuber aestivum*) en estado larvario.
4. Se ha conseguido completar en laboratorio los ciclos biológicos de las especies *Helomyza tuberivora*, *Megaselia* sp. y *Lycoriella* sp., pudiendo ser empleada esta metodología en posteriores estudios de control.
5. El parasitismo observado en *Tuber melanosporum* está correlacionado con el grado de madurez del hongo. Cuanto mayor es esta, más cantidad de coleópteros y miriápodos, no encontrándose esta relación en el caso de dípteros.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **ALONSO PONCE R., ÁGUEDA B., ÁGREDA T., MODREGO M.P., ALDEA J MARTÍNEZ-PEÑA. (2010).** Un modelo de potencialidad climática para la trufa negra (*Tuber melanosporum*) en Teruel (España). Departamento de Investigación y Experiencias Forestales de Valonsadero. Consejería de Medio Ambiente. 19(2), 208-220.
- **ARZONE, A. (1971).** Reperti ecologici ed etologici di *Liodes cinnamomea* Panzervivente su *Tuber melanosporum* Vittadini (Coleoptera Staphylinoidea). Centro di Entomologia Alpina e Forestale del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Pubblicazione n° 158: 317-357.
- **BRATEK Z., PAPP L., MERKL O. (2001).** Beetles and flies living on truffle. Actes du V Congrès International. Science et Culture de la Truffe, Aix en Provence, France: 191-192.
- **BROWNE D.J, SCHOLTZ C.H. (1995).** Phylogeny of the families of Scarabaeoidea (Coleoptera) based on characters of the hindwing articulation, hindwing base and wing venation. Systematic Entomology 20:145-173.
- **CALLOT, G. (1999).** La truffe, la terre, la vie. Ed. INRA editions. Versailles. 7:180-187.
- **CLIFT, A.D. y LARSSON, S.F. (1987).** Phoretic dispersal of *Brennandania lambi* (Kraczal) by mushroom flies (Diptera: Sciaridae and Phoridae) 3: 11-20.
- **COUTIN, R. (1972).** Insects et champignons. Société Versaillaise de Sciences Naturelles: 80-90.
- **CRAWFORD, C.S. (1990).** Millipedes as model Detritivores, 8th International Congress of Myriapodology, Innsbruck, Austria 10: 277-288.
- **DELMAS M. THIERRY T. (1987).** Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) 774-777.
- **DE MIGUEL VELASCO A., SÁEZ GARCÍA FALCES R. (1995).** Guía práctica de truficultura. I.T.G. Universidad de Navarra. 3:34-36.
- **DE MIGUEL VELASCO A., SÁEZ GARCÍA-FALCES R. (2008).** La trufa. Guía de truficultura. Ed. instituto técnico y de gestión agrícola, S.A. ITGA. 132pp.
- **DESSOLAS H., CHEVALIER G , PARGNEY J-C. (2008).** Nouveau Manuel de Trufficulture. Réédition du manuel du Docteur Pradel (1914) réactualisé et amendé par. Ed. Misse en Pages Perigueux (France). Pag: 35, 121-122.

- **FEMCAL. (2011).** Federación de asociaciones micológicas de Castilla y León. Insectos micófagos, estudio de la universidad de Navarra. http://www.famcal.es/index.php?option=com_content&view=category&id=41&layout=blog&Itemid=65 [en línea] consultado diciembre de 2011.
- **FINLEY, R.J., WUEST, P.J., TOYSE, D.J., SNETSINGER, R.J., TETRAULT, R., RINKER, D.L. (1984).** Mushroom flies. *Mushroom J.*, 139: 240-247.
- **GARCÍA-MONTERO, L. G., PÉREZ ANDUEZA, G., DÍAZ, P. MANJÓN, J. L. (2004).** Contribución al conocimiento ecológico de los dípteros fitófagos (Díptera: Heleomyzidae) de las trufas en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, 30: 679-683.
- **GNANESWARAN, S., WIJAYAGUNESAKARA, N. P. (1999).** Survey and identification of insects pest of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) culture in central province of Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research and Extension*. 2 (1): 21-25.
- **GRANETTI B., CIORGIO MATEROZZI A.A. (2005).** Umbria terra di tartufi. Ed. Regione umbría, grupo micologico ternano. 303pp.
- **GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. (2000).** The insects. An outline of Entomology. Blackwell Science. 470 pp.
- **GUISANDE, C., VAAMONDE, A., BARREIRO, A. (2011).** Tratamiento de datos con R, Statistica y SPSS. Ed. Díaz de Santos. 978 pp.
- **HARRINGTON , T. C. 2005.** Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. . *Ecological and Evolutionary Advances in Insects-Fungal Association*. Vega, F. P, and Blackwell, M, eds., Oxford University Press, 257-291.
- **HENRY R., DISNEY L., WITHERS P. (2011).** Scuttle flies (Diptera, Phoridae) reared from tree rotholes in France, including three new species of *Megaselia* Rondani. *Fragmenta Faunistica* 54 (1): 29-41.
- **HOCHBERG, M. E., BERTAULT G., POITRINEAU K., JANSSEN A. (2003).** Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. The Netherlands Entomological Society, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 109: 147-153.

- **IAN HALL R., GORDON BROWN T., ZAMBONELLI A. (2007).** Taming the Truffle. The history, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom. Ed. Timber Press. 304pp.
- **INCAUSA GINÉS A. I. (2001).** Estudio de la calidad esporal de los carpóforos de *Tuber melanosporum* Vitt. Según su procedencia y su influencia posterior en la micorrización artificial de *Quercus ilex* L. Universidad de Zaragoza 68pp.
- **KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER D.W., STALPERS, J.A. (2008).** Dictionary of the fungi 769 pp.
- **KÜES, U., MARTIN, F. (2011).** On the road to understanding truffles in the underground. Fungal Genetics and Biology, 48: 555-560.
- **MARTÍN M, GÓMEZ E., INCAUSA A. (2010).** Guía de buenas prácticas en truficultura. 59pp.
- **MIRANDA-MIRANDA E., COSSIO-BAYUGAR R., MARTINEZ-IBAÑEZ F., BAUTISTA-GARFIAS C.R. (2011).** Megaselia scalaris reare don Rhipicephalus (Boophilus) microplus laboratory cultures. Short communication Mediccal and Veterinary Entomology 25, 344-347.
- **NAVARRO LOZANO M.J, GEA ALEGRÍA F.J, FERRAGUT PÉRZ F.J. (2004).** Biología y control del ácaro miceliófago *Brennandania lambi* (krczal) en los cultivos de champiñón de Castilla-La Mancha” Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 35-76.
- **OLIACH D., BONET J.A., FISCHER C.R., OLIVERA A., MARTÍNEZ DE ARAGÓN J., SUZ L. M., COLINAS C. (2005).** Guía técnica para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). Ed. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya. 30pp.
- **OLIVER J.M, SAUVIGNAC J.C., SOURZAT P. (1996).** Truffe et trufficulture. Ed. Fanlac. 263pp.
- **PACCIONI, G., LALLI, G. (1990).** Strategie adattative di alcuni *Tuber*. Atti Del Secondo Congresso Internazionale Sul Tratufo, Spoleto, Italia: 403-408.
- **PALAZÓN, C., DELGADO, I., BARRIUSO, J. (1999).** “Instalación de trufas artificiales. Requerimientos y posibilidades de cultivo”. 1ª jornadas internacionales sobre truficultura en Aragón. Graus (Huesca). 21-22/10/1999.

- **PALAZÓN C. Y BARRIUSO, J. (2007).** Viveros y producción de planta micorrizada. En: Truficultura. Fundamentos y técnicas. S. Reyna (Ed.). Mundi prensa. 688pp.
- **QUENTIN D. WHEELER (1985).** Larval Characters of a Neotropical Scotocryptus (Coleoptera: Leiodidae), a Nest Associate of Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society* Vol. 93, No. 3 (Jul., 1985), pp. 1082-1088.
- **REYNA DOMENECH, S. (2000).** Trufa, truficultura y selvicultura trufera. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 229 pp.
- **REYNA DOMENECH, S. (2007).** Truficultura. Fundamentos y técnicas. Ed Mundi-Prensa. Madrid, 688 pp.
- **REYNA DOMENECH, S. (2012).** Truficultura. Fundamentos y técnicas. Ed Mundi-Prensa. Madrid, 720 pp.
- **RICARD J., CTIFL (2003).** La truffe. Guide technique de trufficulture. Les editons du Centre Technique interprofessionnel des fruits et legumes. 13:223-224.
- **RICIONNI C., BELFIORI B., CICHOCKI N., LABLÉ J., MORIN E. (2008).** Sex and truffles: first evidence of Perigord black truffle outcrosses 260-263.
- **RIVERA MEDINA S. (2009).** Caracterización, descontaminación y conservación de *Tuber melanosporum* (trufa negra) y *Tuber aestivum* (Trufa de verano) 345pp.
- **RUBINI A., BELFIORI B., RICCIONI C., ARCIONI S., MARTIN F. PAOLOCCI F. (2011).** *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.
- **SÁNCHEZ, J. (2005).** El mundo de los hongos. En Setas de Salamanca. C.J. Valle (Coord.). Ediciones de la Diputación de Salamanca. 461 pp.
- **SÁNCHEZ OSORIO, I. (2005).** Orientación olfativa de "*Cerambyx welensii*" Küster y "*Prinobius germari*" Dejean, principales cerambícidos xilófagos de encina ("*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*") y alcornoque ("*Quercus suber* L."), para la localización de hospedantes. 209pp.

- **SEUNG-GWAN S., HEUNG-S., SAUNGHWAN L. (2012).** Dark winged fungus gants (Diptera: Sciaridae) collected from shiitake mushroom in Korea. 174-181.
- **SOURZAT, P. (1994).** Guide pratique de trufficulture. Station D'Expérimentations sur la Truffe, Cahors. 96 pp.
- **STEINECK HELLMUT (1987).** Cultivo comercial del champiñón” Segunda edición. Ed. Acribia. 86-92.
- **TRAPPE J.M, CASTELLANO J., CLARIDGE A.W. (2001).** Continentan drift, mycophagy, and the biogeography of hypogeus fungi. Actes du V Congrès. International. Science et Culture de la Truffe, Aix en Provence, France : 241-246.
- **VERLHAC A. (1990).** La truffe guide pratique.Ed. CTIFL. Paris. 5:89-96.
- **VIGNOZZI, G., DE ROGATIS, A. (1990).** Iniziative dell'E.T.S.A.F. per lo sviluppo della tartuficoltura in Toscana - Prime osservazioni in una giovane tartufaia sperimentale. Atti Del Secondo Congresso Internazionale Sul Tratufo, Spoleto, Italia: 563-577.
- **VILAS, J. (2011).** Historia de la truficultura y situación actual. Conferencia en el curso introducción a la truficultura. Abril 2011, Biscarrués (Huesca).
- **WHITE, P.F. (1987).** The mushroom pest complex-its affect on yield and quality. En: Cultivating Edible Fungi. 301-310.
- **ZELLER B., BREKET C., MANRICE J.P. LE TACON F. (2008).** Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on C₁₃ and N₁₅ natural abundance. Ann. For. Sci. 65 607pp.
- Études sur les truffes comestibles au point de vue Botanique, Entomologique, Foriestier et Commercial Henry Bonnet, 1869.
http://books.google.com.na/books?id=gsIUAAAAYAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_similarbooks_r&cad=2#v=onepage&q&f=false [en línea] consultado enero de 2012.
- United States Department of Agriculture. Forest Service, Southern Region, Southern Research Station. Research Station.
<http://www.fs.fed.us/r8/foresthealth/pubs/oakpests/contents.html> [en línea] consultado febrero de 2012.

- The Government Department Responsible for the Protection and Expansion of Britain's Forests and Woodlands. <http://www.forestresearch.gov.uk/> [en línea] consultado abril de 2012.
http://www.marm.es/es/biodiversidad/temas/montes-y-politica-forestal/AEF_2008_COMPLETO_tcm7-158056.pdf [en línea] consultado en mayo 2012.
- <http://www.faunaeur.org> [en línea] consultado en junio 2012.