



2022
Lleida

27·1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022
ISBN 978-84-941695-6-4
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Determinación del micelio de trufa negra y su relación con parámetros edáficos en plantaciones y zonas de producción silvestre

BAROU, V.¹, CALVET, C.¹, CAMPRUBÍ, A.¹, DE MIGUEL, A.M.², PERA, J.¹, PROBANZA, A.⁴, RINCÓN, A.M.³, PARLADÉ, J.¹

¹ Protecció Vegetal Sostenible. IRTA. Ctra. Cabrils km 2. E-08348 Cabrils, Barcelona.

² Departamento de Biología Ambiental, Universidad de Navarra, E-31080 Pamplona.

³ Instituto de Ciencias Agrarias, ICA-CSIC. C/ Serrano 115 dpdo., E-28006 Madrid.

⁴ Universidad San Pablo CEU, C/ Isaac Peral 58, E-28040 Madrid.

Resumen

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) es uno de los hongos comestibles más apreciados a nivel mundial. Se produce de forma natural en varios países Mediterráneos y también se cultiva junto con ciertas especies forestales con las que forma micorrizas. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre la biomasa micelial de *T. melanosporum* y las propiedades del suelo en plantaciones y zonas de producción natural de este hongo en España. Los suelos se muestrearon en quemados (zonas con escasa vegetación que rodean a los árboles productores) de más de cien árboles en otoño de 2019. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de los suelos, se extrajo su ADN total y, mediante qPCR, se cuantificó específicamente el micelio de trufa negra presente en el suelo. La cantidad de micelio de trufa fue similar en plantaciones y zonas de producción natural, aunque se detectaron correlaciones significativas entre la biomasa fúngica y determinadas variables edáficas que sí mostraron patrones distintos en plantaciones y zonas silvestres como pH, materia orgánica, nitrógeno, hierro y magnesio. Los resultados obtenidos se discuten en relación con las prácticas de manejo de las plantaciones truferas y el potencial de aplicabilidad de los mismos para evaluar la productividad de las plantaciones.

Palabras clave

Tuber melanosporum, propiedades del suelo, qPCR, brûlé o quemado, productos forestales no maderables, ectomicorrizas.

1. Introducción

La trufa negra es el cuerpo fructífero del hongo hipogeo *Tuber melanosporum* Vittad. En Europa, este hongo se ha recolectado en bosques abiertos en el área Mediterránea durante muchos siglos, aunque, a partir del siglo XX, la mayor producción de trufa negra se obtiene en plantaciones (Chen et al., 2016). De hecho, en el sur de Francia y noreste de España, se destinan cada año a nuevas plantaciones truferas en torno a 16 km² de tierra de uso agrícola (Büntgen et al., 2019). El avance en la inoculación de plantas huésped con *T. melanosporum* ha permitido su cultivo en zonas fuera de su hábitat natural (Chen et al., 2016) como en EE. UU., Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda, Marruecos, Sudáfrica, China y Suecia (Reyna & Garcia-Barreda, 2014). A nivel mundial, la cosecha anual de trufa negra llega a los 120 000 kg y los ingresos generados se estiman en torno a 50 millones de euros (Oliach et al., 2020).

A nivel biológico, el micelio de la trufa negra inhibe la formación de la vegetación herbácea en la zona alrededor del tronco del árbol huésped produciendo los denominados “brûlés” o “quemados”, (Le Tacon, 2017). En términos ecológicos, el suelo es el medio donde se desarrolla el micelio de la trufa que seguidamente establece una relación simbiótica ectomicorrícica con las raíces de plantas forestales y finalmente forma cuerpos fructíferos. Por tanto, es importante ampliar el conocimiento de los factores edáficos que facilitan el desarrollo del micelio y, en consecuencia, la producción de la trufa negra (Jaillard et al., 2016).

Los requisitos agronómicos recomendados para el cultivo de la trufa negra se han obtenido a partir de numerosos estudios observacionales (Bonet et al., 2009). Para el óptimo manejo de los sistemas agroforestales de la trufa negra es importante comprender la interacción entre el hongo y las variables ambientales, incluidas las edáficas. Tanto el efecto de la temperatura como el de la precipitación se han examinado en previos estudios en los que se ha observado que esas variables afectan a la biomasa del micelio extraradical (Queralt et al., 2017) y a la producción de la trufa negra, principalmente durante los meses de verano (Baragatti et al., 2019; Büntgen et al., 2019; García-Barreda et al., 2020). Hasta el momento, se han llevado a cabo estudios de ámbito local (Castrignanò et al., 2000; Colinas et al., 2007; García-Montero et al., 2007), pero no a escalas espaciales mas amplias que permitan establecer relaciones generales entre el desarrollo del hongo y las condiciones edáficas.

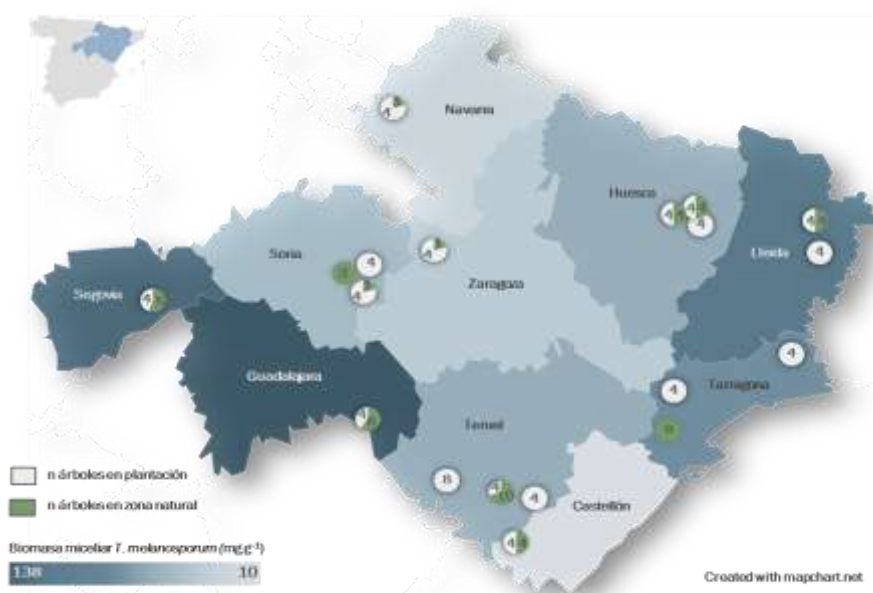
2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue determinar la relación entre la biomasa miceliar de *T. melanosporum* y las características fisicoquímicas del suelo de plantaciones y zonas de producción natural de trufa negra en España. Se esperaba que el tipo de suelo condicionase la cantidad de micelio de trufa negra y, en particular, que la biomasa de micelio en plantaciones, donde se hace un tratamiento agronómico para potenciar la presencia del hongo, fuese mayor que en zonas de producción natural.

3. Metodología

Se seleccionaron 19 sitios ubicados en localidades representativas del área de distribución natural de la trufa negra al noreste de España y dos tipos de parcela: a) plantaciones en producción (17 sitios) y b) zonas de producción silvestre de trufa negra (12 sitios) (Figura 1). Por cada parcela, se eligieron 4 árboles de la especie *Quercus ilex* L. productores de trufa, con un total de 123 encinas seleccionadas. El rango de altitudes sobre el nivel del mar (m s. n. m.) oscila entre 398 y 1415 m, con una media de 936 m (Tabla 1). La temperatura media anual de todas las parcelas está entre 9,3 y 14,4 °C, y la precipitación media anual acumulada entre 409 y 839 mm (Fick & Hijmans, 2017).

Figura 1. Promedio de la biomasa miceliar (mg g^{-1} suelo) de *Tuber melanosporum* obtenido por provincia (más oscuro=más cantidad) y número de árboles muestreados (123 en total) en plantaciones y zonas de producción natural en cada zona de muestreo.



Muestreo y procesado de las muestras

El muestreo de suelo se realizó durante octubre y noviembre de 2019. Se retiró un cilindro de suelo de 4 cm de diámetro y 10-20 cm de profundidad del centro del brúlé (entre el borde externo del brúlé y el tronco del árbol) con una sonda metálica. Por cada árbol, se recogieron cuatro cilindros siguiendo dos líneas perpendiculares al tronco y se mezclaron para obtener una muestra compuesta por árbol. Las muestras de suelo se mantuvieron a 4 °C hasta su procesado. Cada muestra se tamizó con un cedazo de 2 mm para eliminar piedras y raíces, y posteriormente se secó en una estufa con circulación de aire a 40 °C.

Extracción de ADN y cuantificación del micelio de *Tuber melanosporum* Vittad.

Se extrajo el ADN total de 0,25 g de cada muestra de suelo con el kit DNeasy Power Soil HTP 96 kit (Qiagen, Alemania) según el protocolo del fabricante. La concentración del ADN de las muestras se determinó por NanoDrop™ 3300 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, E.E.U.U).

Para cada muestra de suelo, se cuantificó la biomasa miceliar de *T. melanosporum* mediante real-time Taqman® PCR (qPCR) con el sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific, Wilmington, E.E.U.U). Se utilizaron los cebadores específicos, la sonda, y las condiciones de PCR descritas en Parladé et al. (2013), y la curva patrón de cada placa se creó siguiendo la metodología descrita en Parladé et al. (2007). Brevemente, se tomaron 0.01 g de esporocarpio inmaduro, seco y molido de *T. melanosporum* y se extrajo el ADN con el kit Soil DNA Isolation Plus kit (Norgen, Biotek Corp., Canadá) Se hicieron cuatro diluciones seriadas del ADN obtenido (1:10, v: v) con las que se realizó la qPCR. Para estas diluciones se obtuvieron los valores Ct (número de ciclos en los que la señal fluorescente supera el nivel de fondo y cruza la línea de umbral establecida en la fase exponencial del gráfico de amplificación) que se representaron frente a la correspondiente cantidad inicial de micelio del esporocarpio, con lo que se obtuvo la curva patrón. Se siguieron las directrices MIQE de la información mínima para la publicación de los experimentos cuantitativos con real-time PCR (Bustin et al., 2009). Los valores Ct obtenidos para las muestras de suelo se interpolaron en la curva patrón correspondiente para obtener el valor de cantidad de micelio de *T. melanosporum*.

Se determinaron distintos parámetros fisicoquímicos de los suelos siguiendo protocolos estándar de análisis (MAPA, 1986). La textura del suelo (% de arena, limo, arcilla) se determinó mediante el método Bouyoucos. El pH y la conductividad eléctrica (CE) se midieron en solución acuosa (1:25, w:v). La materia orgánica (MO) se determinó por calcinación (400° C, 4 horas). La humedad gravimétrica (HG) del suelo se determinó por diferencia de peso tras secar la muestra a 105° C. La caliza activa en el suelo se determinó por extracción con oxalato de amonio y posterior valoración. También se cuantificaron el nitrógeno orgánico (N) (método Dumas) y el fósforo disponible (P) (método Olsen) en los suelos. Tras extracción con acetato de amonio (1 M, pH 7) para potasio (K), calcio (Ca), sodio (Na) y magnesio (Mg), o con DTPA (0.005 M, pH 7,3) para hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), zinc (Zn), aluminio (Al), plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni) y boro (B), todos estos elementos se determinaron por espectrometría de emisión por plasma inductivamente acoplado (ICP, Optima 4300 DV, Perkin Elmer, Waltham, E.E.U.U).

Análisis estadístico

Los datos de biomasa del micelio de trufa se analizaron mediante modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) teniendo en cuenta el tipo de parcela (bosque o plantación) como factor fijo y el sitio y su interacción con el tipo de parcela como factores aleatorios. Se realizaron correlaciones de Pearson o Spearman (en caso de datos con distribución no normal) entre el micelio y las distintas variables medidas. Los análisis se realizaron con el programa estadístico JMP®, versión 16 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021).

4. Resultados

Se procesaron muestras de suelo de un total de 123 árboles en bosques y plantaciones productoras de trufa, ubicados en 10 provincias dentro del área de distribución natural de la trufa negra en España (Figura 1).

Los valores medios de los diferentes parámetros medidos en 72 árboles de plantación y 51 de bosque se muestran en la Tabla 1. Las diferencias fueron significativas en el porcentaje de arcilla (mayor en plantaciones), el porcentaje de materia orgánica (mayor en bosque), la cantidad de hierro (mayor en bosque) y de aluminio (mayor en bosque). En promedio, la cantidad de micelio de trufa en suelo fue mayor en bosque que en plantación, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 1).

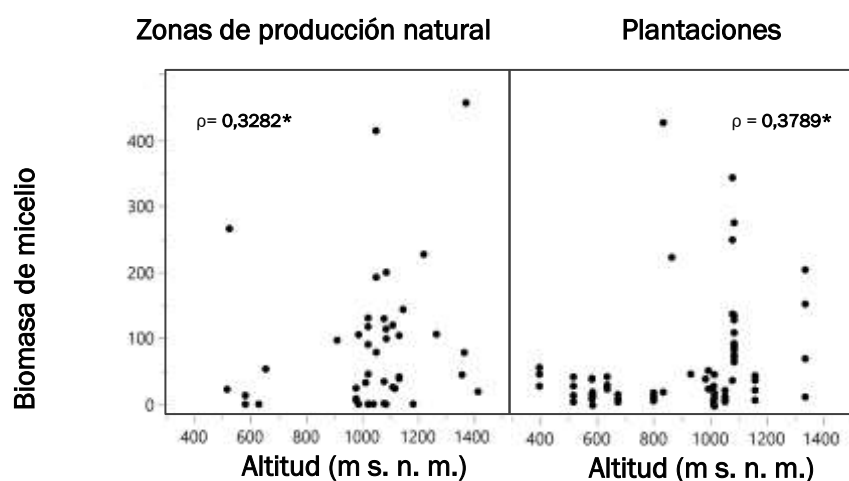
Tabla 1. Valores de Medias \pm Error Estándar y valores F de la biomasa del micelio, la altitud y las variables del suelo) (ANOVA * $p < 0.05$, valores significativos resaltados en negrita) entre muestras de plantaciones ($n = 72$ árboles) y bosque ($n = 51$ árboles). El tipo de parcela se ha considerado como factor fijo y la localidad y la interacción entre el tipo de parcela y la localidad se han incluido como factores aleatorios dentro del modelo y. Bio=biomasa de micelio, HG=humedad gravimétrica, CE=conductividad eléctrica, MO=materia orgánica.

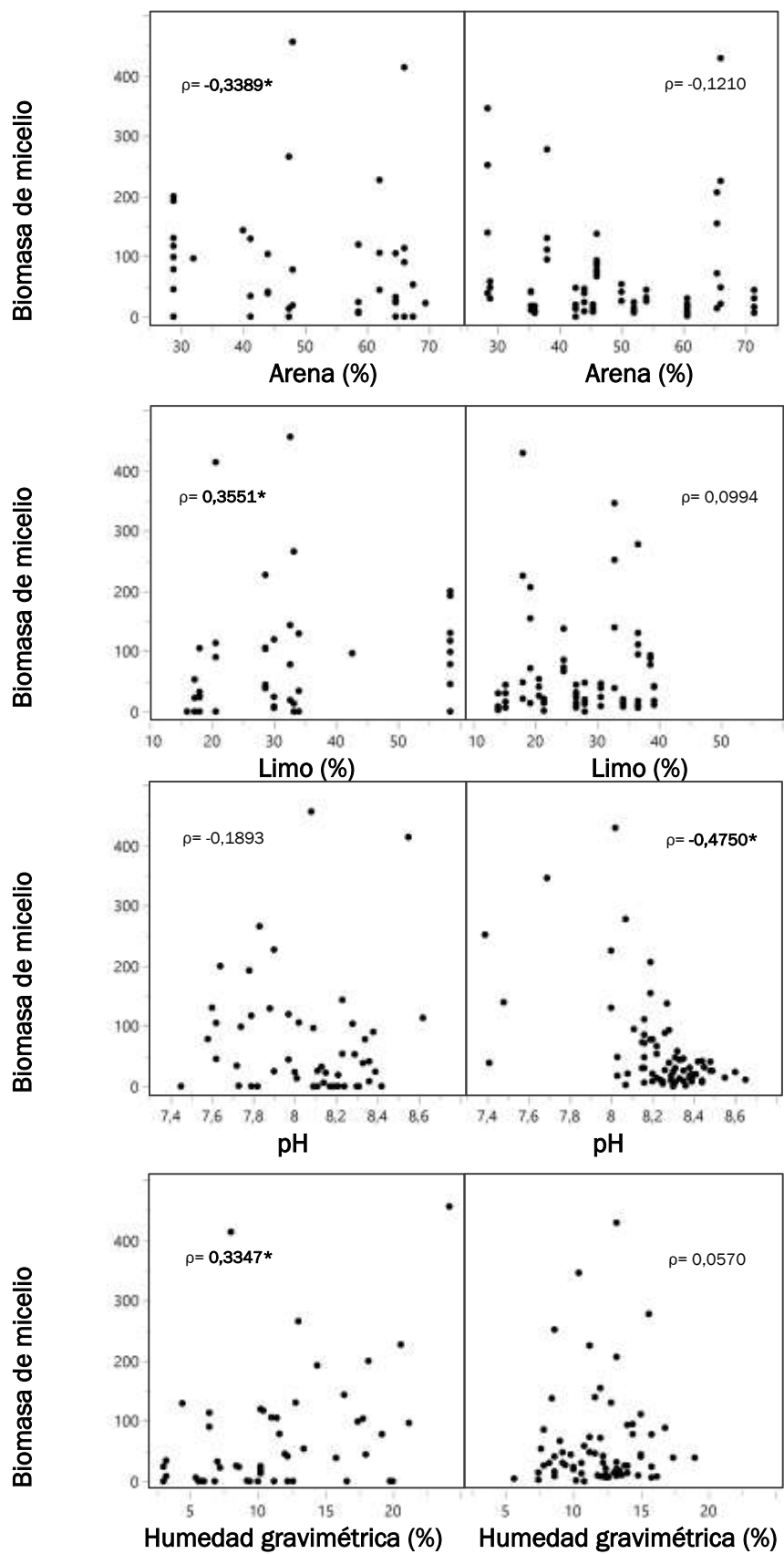
	Plantaciones	Zonas de producción natural	Valores F
BIO (mg g ⁻¹ suelo)	60,6 \pm 9,5	74,1 \pm 13,8	0,48
Altitud (m s. n. m.)	887 \pm 30,3	1006 \pm 30,7	2,21
Arena (%)	48,4 \pm 1,5	52,3 \pm 2,0	0,97
Pedregosidad (%)	39,9 \pm 2,2	39,4 \pm 2,8	3,21
Arcilla (%)	24,3 \pm 0,8	16,8 \pm 0,7	9,24*
Caliza activa (%)	5,7 \pm 0,5	3,1 \pm 0,4	1,25
HG (%)	12,0 \pm 0,3	11,4 \pm 0,8	0,02
CE (μ S/cm)	376,7 \pm 9,8	400,5 \pm 25,7	3,80
pH	8,23 \pm 0,03	8,05 \pm 0,04	3,27
MO (%)	3,9 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5	7,38*
N (%)	0,13 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	4,02
P (mg kg ⁻¹)	9,0 \pm 1,4	3,0 \pm 0,5	3,06
K (mg kg ⁻¹)	172,4 \pm 12,3	126,2 \pm 7,9	4,13
Fe (mg kg ⁻¹)	6,0 \pm 0,3	10,5 \pm 1,2	6,97*
Ca (mg kg ⁻¹)	3464 \pm 110	3278 \pm 142	1,94
Na (mg kg ⁻¹)	18,6 \pm 2,8	13,5 \pm 2,7	0,71

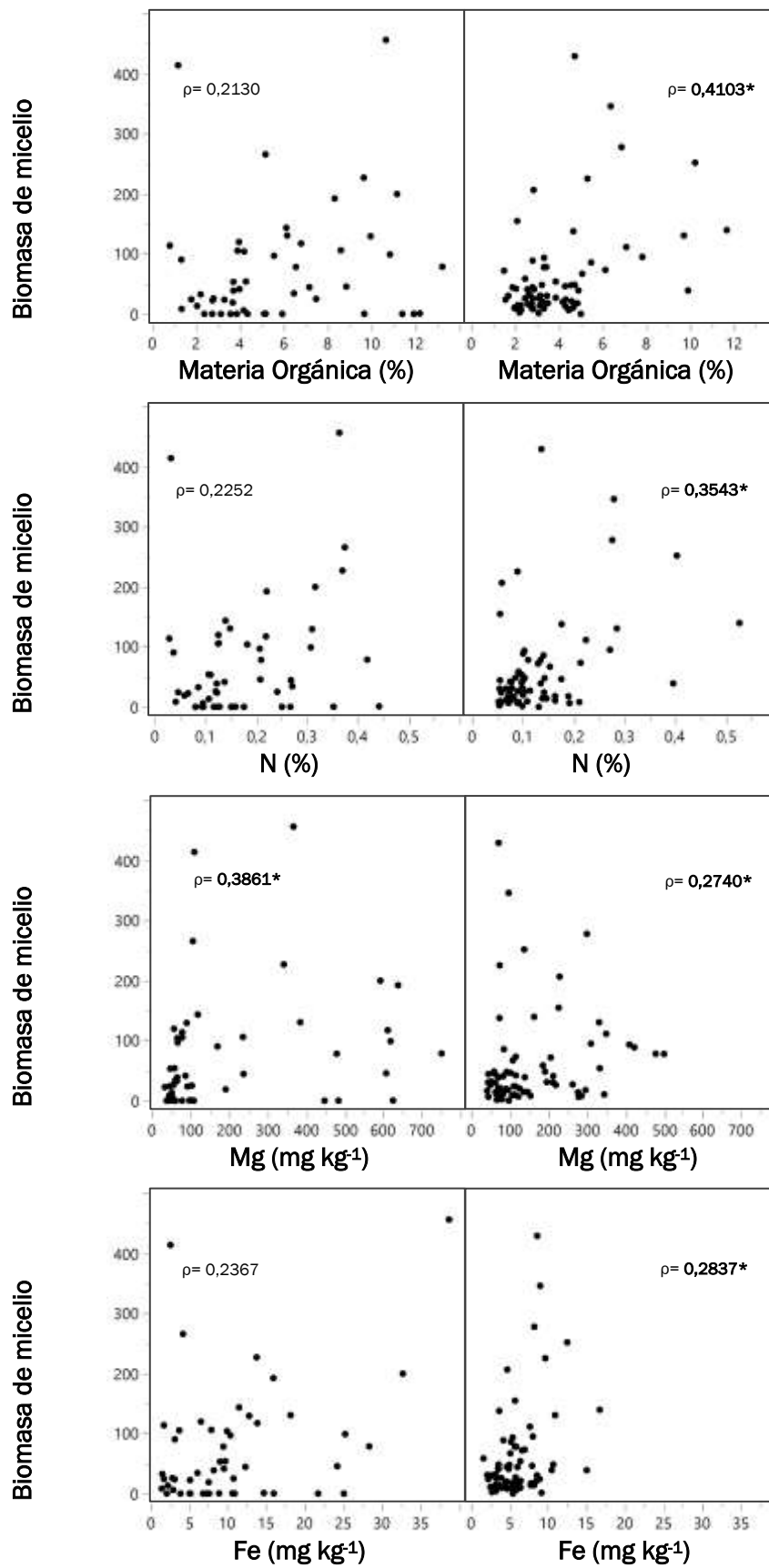
Mg (mg kg ⁻¹)	156,3 ± 13,3	199, 3 ± 29,6	0,69
Cu (mg kg ⁻¹)	0,4 ± 0,06	0,2 ± 0,02	2,91
Mn (mg kg ⁻¹)	9,6 ± 0,5	9,1 ± 0,6	0,03
Al (mg kg ⁻¹)	0,33 ± 0,04	0,6 ± 0,1	8,14*
B (mg kg ⁻¹)	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,78
Zn (mg kg ⁻¹)	2,9 ± 0,3	2,2 ± 0,3	4,25
Pb (mg kg ⁻¹)	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,34
Cd (mg kg ⁻¹)	0,03 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,00
Ni (mg kg ⁻¹)	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,01	1,44

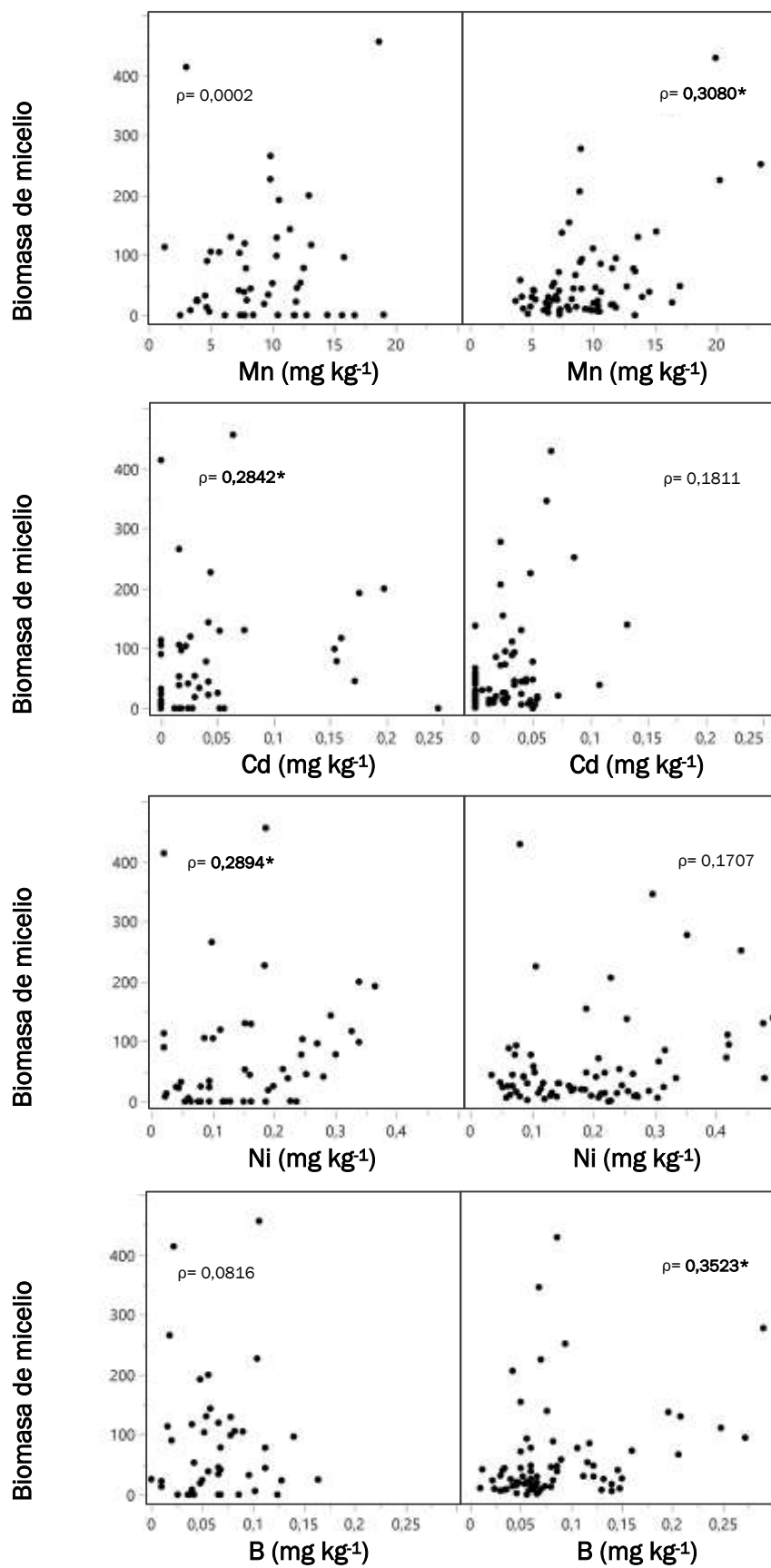
Las correlaciones significativas entre los valores de micelio, los diferentes parámetros del suelo y la altitud para alguno de los tratamientos (bosque o plantación) se muestran en la Figura 2. En el caso del bosque, se observó una correlación positiva entre el micelio de trufa y la altitud, el contenido en arena y limo, la humedad gravimétrica del suelo, así como el contenido de magnesio, cadmio y níquel de los suelos. En plantación, las correlaciones positivas entre el micelio y parámetros del suelo fueron significativas para la materia orgánica, y el contenido en nitrógeno, magnesio, hierro, manganeso y boro de los suelos. Sólo se observó una correlación negativa entre el micelio y el pH en plantación. Por otro lado, la única variable edáfica que mostró una correlación positiva con la cantidad de micelio de trufa tanto en bosque como plantación fue el magnesio.

Figura 2. Correlaciones entre los valores de la biomasa micelar (mg g⁻¹ suelo) de *Tuber melanosporum* y la altitud y los parámetros edáficos de las muestras obtenidas en zonas de producción natural (n = 51 árboles) o plantaciones (n = 72 árboles). Sólo se muestran las variables con correlación significativa para alguno de los tratamientos (coef. Spearman ρ , valores significativos * $p < 0.05$).









5. Discusión

Entre los valores edáficos que determinan la estructura del suelo (materia orgánica, calcio, textura) observamos un mayor contenido en arcilla en plantaciones de trufa negra respecto a bosques con producción natural del hongo, así como un mayor contenido en materia orgánica en bosque. En cualquier caso, los niveles de arcillas se sitúan en el rango medio de trufas silvestres y dentro de los límites recomendados para el cultivo (García-Barreda et al., 2012). Aunque se encontró mayor cantidad de materia orgánica en bosques que en plantaciones, en ambos casos los valores promedio están dentro de los límites recomendados para el cultivo de la trufa (Colinas et al., 2007). El contenido en hierro en los suelos de bosques y plantaciones también resultó normal y dentro de los límites de variabilidad respecto a los análisis realizados en trufas productoras de *T. melanosporum* en Italia (Bencivenga et al., 1990) y España (Colinas et al., 2007).

Aunque se detectó significativamente más aluminio en bosque que en plantaciones, los valores obtenidos fueron bajos en general y la alcalinidad de los suelos hace que la presencia de Al soluble no comporte riesgo de bio-toxicidad.

Se encontraron correlaciones positivas significativas entre la cantidad de micelio de trufa y determinados parámetros del suelo. La biomasa de micelio en el suelo se ha relacionado cuantitativamente con la productividad de *T. melanosporum* (Queralt et al., 2017), por lo que aquellos parámetros que se correlacionen positivamente con el micelio en plantaciones podrían ser susceptibles de manejo para optimizar la producción. Entre estos parámetros se encuentran la materia orgánica, el pH, el N, el Mg, el Fe y el B. Teniendo en cuenta que la materia orgánica del suelo es significativamente menor en plantaciones (3,9%) que en bosques (5,7%) y que el óptimo en trufas está entre el 5-15% (García-Barreda et al., 2012), el margen de mejora en plantaciones es considerable.

El pH es un parámetro fundamental para la producción de trufa negra, ya que este hongo solamente fructifica en suelos alcalinos. Raglione et al. (2001) establecieron en 7,6 el valor mínimo para el desarrollo de la trufa. En este estudio, hemos observado una correlación negativa entre el pH de plantaciones (8,23 en promedio) y la producción de micelio. Esta correlación no se ha producido en bosques de producción natural (pH promedio 8,05), aunque las diferencias de pH no resultaron significativas entre bosque y plantación. La revisión de los datos disponibles de diferentes autores sitúa el pH óptimo alrededor de 8 (Colinas et al., 2007), por lo que las zonas de producción natural estarían más cerca de este valor promedio. También hay que considerar que la disponibilidad de determinados nutrientes clave, como el P, disminuye a pH elevados, lo que podría afectar a la planta hospedadora (*Quercus ilex*) y a la traslocación de hidratos de carbono al micelio. Este proceso podría estar mejor regulado en suelos forestales que en plantaciones, con mayor concentración de materia orgánica y capacidad tamponadora del pH en el primer caso.

Respecto al N, se considera que este macronutriente se encuentra tanto en bosque como en plantación en concentraciones adecuadas para el crecimiento de las plantas y que un exceso podría perjudicar la micorrización y, por tanto, la producción de trufas (Colinas et al., 2007). Sin embargo, se ha observado una correlación positiva entre la abundancia de N en plantaciones y la biomasa miceliar. Además, la cantidad de N total en plantación y bosque está por debajo de los límites recomendados para la producción de la trufa negra (Colinas et al. 2007) por lo que la fertilización con N, dentro de esos límites, podría ser una posibilidad para mejorar la cantidad de micelio en el suelo.

El contenido en magnesio del suelo también se ha correlacionado positivamente con el micelio en el suelo tanto en plantación como en bosque, aunque este macroelemento no se considera relacionado con la productividad de la trufa (Sourzat, 2001). La falta de información sobre la

fertilización con Mg y la correlación positiva con la biomasa micelar, tanto en bosque como en plantación, abren un valioso campo de investigación sobre las posibilidades de mejorar la producción de trufas mediante fertilización.

La disponibilidad de hierro es generalmente baja en suelos alcalinos. Sin embargo, se ha observado que la fertilización con Fe favorece la colonización de otros hongos ectomicorrícicos en detrimento de la trufa, por lo que no es recomendable (Mamoun & Olivier, 1993). Nuestros resultados indican una relación positiva entre el micelio de la trufa y el contenido en hierro en plantaciones, por lo que no sería descartable incluir el Fe en los programas de fertilización en zonas con niveles muy bajos (por debajo de 10 mg kg^{-1}).

El contenido en Mn fue muy bajo en las muestras analizadas. La baja presencia de Mn en el suelo de trufas se atribuye a la oxidación de este elemento en los quemados (brulés) bien aireados (Lulli et al., 1999). La presencia de Mn en nuestras muestras se correlaciona significativamente con un aumento del micelio en el suelo de plantaciones. Raglione et al. (2001) demostraron que los niveles de hierro y manganeso extraídos con EDTA permitían discriminar suelos productores de *T. melanosporum* de suelos productores de *Tuber brumale* Vittad. o *Tuber aestivum* Chatin, aunque estudios posteriores en España (Jaillard et al., 2014) no encontraron que este elemento fuera determinante, aunque lo atribuyeron a un diferente comportamiento según el tipo de suelo.

Entre los parámetros del suelo que únicamente se correlacionaron con el micelio en bosque se encuentran el contenido en arena (negativamente), limo y la humedad del suelo (positivamente). La trufa prefiere suelos bien aireados, aunque la falta de humedad puede ser un problema en zonas de producción natural, no irrigadas, por lo que la presencia de elementos finos del suelo podría proteger más al micelio de la desecación en estos casos (Morcillo et al., 2015).

6. Conclusiones

En conclusión, no se encontraron diferencias significativas en la biomasa micelar de *T. melanosporum* en el suelo entre plantaciones productoras y bosques de producción natural, aunque la cantidad media de biomasa fue ligeramente superior en bosques. Estudios anteriores mostraron una mayor biomasa fúngica en bosques anexos a plantaciones de trufa (Parladé et al., 2013). Dado que la detección de ADN de *T. melanosporum* en suelo incluye tanto micelio como esporas, esta diferencia podría atribuirse a una mayor concentración de estas últimas en zonas naturales donde se produce la dispersión natural de esporas por animales, a diferencia de las plantaciones. Sin embargo, no es descartable que se pueda mejorar la concentración de biomasa micelar de trufa mediante la fertilización con aquellos elementos que se correlacionan positivamente con el desarrollo micelar. Es necesaria más investigación para establecer niveles óptimos de concentración de nutrientes biodisponibles, biomasa micelar de trufa y su relación con la fructificación en el suelo de plantaciones.

7. Agradecimientos

La investigación presentada en esta publicación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU), la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) mediante el proyecto TUBERSYSTEMS (RTI2018-093907-B-C21/2).

8. Bibliografía

BARAGATTI, M.; GROLLEMUND, P.M.; MONTPIED, P.; DUPOUEY, J.L.; GRAVIER, J.; MURAT, C.; LE TACON, F.; 2019. Influence of annual climatic variations, climate changes, and sociological

factors on the production of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) from 1903–1904 to 1988–1989 in the Vaucluse (France). *Mycorrhiza*. 29, 113–125

BENCIVENGA, M.; CALANDRA, R.; GRANETTI, B.; 1990. Ricerche sui terreni e sulla flora delle tartufaie naturali di *Tuber melanosporum* Vitt. dell'Italia Centrale. En: Atti del Secondo Congresso Internazionale sul Tartufo, 24-27 novembre 1988, Spoleto, Italia, 337-374

BONET, J.A.; OLIACH, D.; FISCHER, C.R.; OLIVERA, C.; MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J.; COLINAS, C.; 2009. En: PALAHI, M.; BIROT, Y.; BRAVO, F.; GORRIZ, E.; (EDS). Modelling, valuing, and managing Mediterranean forest ecosystems for nontimber goods and services. *EFI proceedings* 57: 57–71

BÜNTGEN, U.; OLIACH, D.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; LATORRE, J.; EGLI, S.; KRUSIC, P.J.; 2019. Black truffle winter production depends on Mediterranean summer precipitation. *Environmental Research Letters*. 14. 074004

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C. T.; 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4). 611–622

CASTRIGNANÒ, A.; GOOVAERTS, P.; LULLI, L.; BRAGATO, G.; 2000. A geostatistical approach to estimate probability of occurrence of *Tuber melanosporum* in relation to some soil properties. *Geoderma*. 98(3):95–113

CHEN, J.; MURAT, C.; OVIATT, P.; WANG, Y.; LE TACON, F.; 2016. The Black Truffles *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum*. En: IOTTI, M., ZAMBONELLI, A. Y MURAT, C.; 2016. *True Truffle (Tuber spp.) in the World*. Vol. 47

COLINAS, C.; CAPDEVILA, J.M.; OLIACH, D.; FISCHER, C.; BONET, J.A.; 2007. Mapa de aptitud para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Cataluña. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Solsona

FICK, S.E.; & HIJMANS, R.J.; 2017. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 37(12), 4302-4315

GARCIA-BARREDA, S.; CAMARERO, J.J.; VICENTE-SERRANO, S.M.; SERRANO-NOTIVOLI, R.; 2020. Variability and trends of black truffle production in Spain (1970-2017): Linkages to climate, host growth, and human factors. *Agricultural and Forest Meteorology*. 287. 107951

GARCIA-BARREDA, S.; REYNA, S.; PÉREZ, R.; RODRÍGUEZ BARREAL, J.A.; DOMÍNGUEZ, A. 2012. Ecología de la trufa y las áreas truferas. En: Truficultura. Fundamentos y Técnicas. S. Reyna (coordinador). Ed. Mundi-Prensa, 151-206

GARCÍA-MONTERO, L.G; MANJÓN, J.L.; PASCUAL, C.; GARCÍA-ABRIL, A.; 2007. Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. *Forest Ecol. Manag.*, 242, 288-296

- JAILLARD, B.; BARRY-ETIENNE, D.; COLINAS, C.; DE MIGUEL, A. M.; GENOLA, L.; LIBRE, A.; VILLENEUVE, M.; 2014. Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. *Forest Systems*. 23(2), 364–377
- JAILLARD, B.; OLIACH, D.; SOURZAT, P.; COLINAS, C.; 2016. Soil Characteristics of *Tuber melanosporum* Habitat. En: IOTTI, M., ZAMBONELLI, A. Y MURAT, C.; 2016. *True Truffle (Tuber spp.) in the World*. Vol. 47
- LE TACON, F.; 2017. Biologie. Chapitre 3/Les brûlés. En: Les Truffes. Biologie, écologie et domestication. 76. AgroParisTech. Nancy, France.
- LULLI, L.; BRAGATO, G.; GARDIN, L.; 1999. Occurrence of *Tuber melanosporum* in relation to soil surface layer properties and soil differentiation. *Plant Soil* 214: 85-92
- MAMOUN, M.; & OLIVIER, J.M.; 1993. Effect of iron amendment on the development of the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum* and the rhizoplane bacteria. *European Journal of soil Biology* 29: 83-90
- MORCILLO, M.; SÁNCHEZ, M.; VILANOVA, X.; 2015. Truffle farming today. A comprehensive world guide. Ed: *Micología Forestal & Aplicada*. Barcelona, Spain.
- OLIACH, D.; MORTE, A.; SÁNCHEZ, S.; NAVARRO-RÓDENAS, A.; MARCO, P.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍN-SANTAFÉ, M.; FISCHER, C.; ALBISU, L.M.; GARCIA-BARREDA, S.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; COLINAS, C.; 2020. Las trufas y las turmas. En: SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, M., CALAMA, R., BONET, J.A. (eds.), *Los productos forestales no madereros en España: Del monte a la industria*, Monografías INIA: Serie Forestal, 31, Ministerio de Economía Industria y Competitividad, Madrid (2020)
- PARLADÉ, J.; DE LA VARGA, H.; DE MIGUEL, A. M.; SÁEZ, R.; PERA, J.; 2013. Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. *Mycorrhiza*, 23(2), 99–106
- PARLADÉ, J.; HORTAL, S.; PERA, J.; GALIPIENSO, L.; 2007. Quantitative detection of *Lactarius deliciosus* extraradical soil mycelium by real-time PCR and its application in the study of fungal persistence and interspecific competition. *Journal of Biotechnology*. 128(1), 14–23
- QUERALT, M.; PARLADÉ, J.; PERA, J.; DE MIGUEL, A.M.; 2017. Seasonal dynamics of extraradical mycelium and mycorrhizas in a black truffle (*Tuber melanosporum*) plantation. *Mycorrhiza*. 27:565–576
- RAGLIONE, M.; SPADONI, M.; CAVELLI, S.; LORENZONI, P.; DE SIMONE, C.; 2001. Les sols des truffières naturelles de *Tuber melanosporum* Vitt. dans l'Apennin Central (Italy). En: Actes du Ve Congrès International, Science et Culture de la Truffe, 4-6th March 1999, Aix-en-Provence, France. 5276-5280
- REYNA, S.; & GARCIA-BARREDA, S.; 2014. Black truffle cultivation: A global reality. *Forest Systems*. 23(2), 317–328

SOURZAT, P.; 2001. Les limites des critères agronomiques dans l'analyse de terre en trufficulture. En: Actes du Ve Congrès International, Science et culture de la truffe, 4 au 6 mars 1999, Aix-en-Provence, France, 5281-5286.