



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).

Alumno: Iván Franco Manchón

Tutor: Pablo Martín Pinto

Directores: Luis Santos del Blanco y Jaime
Olaizola Suárez

Septiembre de 2020

ÍNDICE

RESUMEN-ABSTRACT	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. INTERDEPENDENCIA ENTRE ESPECIES ARBÓREAS Y HONGOS.....	3
1.2. LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS ESPECIES ARBÓREAS.....	4
1.3. LA ARQUITECTURA GENÉTICA DE CARACTERES RELACIONADOS CON LA INTERACCIÓN DE LAS ESPECIES ÁRBÓREAS CON HONGOS ECTOMICORRÍCICOS	4
1.4. CASO PARTICULAR DE ESTUDIO: LA INTERACCIÓN A NIVEL DE MICORRIZACIÓN ENTRE <i>Tuber melanosporum</i> Y <i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	5
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. SELECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL DE PARTIDA	8
3.2. PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS MICORRIZADAS	10
3.3. DISPOSICIÓN, MANTENIMIENTO Y CUIDADO DE PLÁNTULAS MICORRIZADAS EN VIVERO	15
3.4. EVALUACIÓN DE LAS PLÁNTULAS MICORRIZADAS	16
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
4 RESULTADOS	20
4.1. RESULTADOS PRELIMINARES.....	20
4.2. ENSAYO DE PROCEDENCIAS	21
4.3. ENSAYO DE PROGENIES.....	25
4.4. PARÁMETROS DE GENÉTICA CUANTITATIVA	28
5 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
5.1. VARIACIÓN ENTRE Y DENTRO DE PROCEDENCIAS	29
5.2. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA SIMBIOSIS ÁRBOL - HONGO	31
5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	33
5.4. IMPLICACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTA MICORRIZADA CON <i>T. melanosporum</i>	33

6 CONCLUSIONES	35
7 AGRADECIMIENTOS.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXO I: SCRIPIT.....	42

RESUMEN-ABSTRACT

Las especies forestales de climas templados suelen presentar relaciones simbióticas con hongos a través de ectomicorrizas. Algunos estos hongos simbióticos son de alto valor culinario y económico. En algunos casos pueden llegar a ser cultivados dado que las producciones silvestres han mermado en las últimas décadas. Un ejemplo, es el cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum*) utilizando a la encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) como árbol hospedante. Esta asociación se consigue produciendo la encina micorrizada en vivero. Actualmente, es uno de los tipos de planta con mayor demanda, pero a su vez necesita mucha mejora en términos de calidad. Uno de los parámetros de calidad más demandados es el porcentaje de micorrización por parte de este hongo. Aprovechando el conocimiento sobre la base genética de las especies forestales de clima mediterráneo, y la existencia experiencias favorables sobre micorrización con otras especies de hongos a nivel de genética cuantitativa, se planteó realizar un estudio con este binomio de especies para comprobar si una de las mejoras en la calidad de esta planta podría venir por la vía genética. Para ello, se aplicaron herramientas de genética cuantitativa en dos experimentos. En ambos, se trató de producir este tipo de planta bajo las mismas condiciones ambientales y de inoculación. En el primero se testó la variabilidad de este carácter, y de otros (diámetro, altura, número de ápices radiculares totales y número de ápices radiculares micorrizados con *T. melanosporum*), para 5 procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota* y en el otro se testaron los mismos caracteres pero a nivel de progenies en dos procedencias. Se constató la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de micorrización para los factores procedencia y progenie, reflejados en una diferenciación cuantitativa entre poblaciones, Q_{st} , de 0,28 y una heredabilidad en sentido estricto, h^2 , de 0,37. Estos resultados abren la puerta al emprendimiento de futuros programas de mejora genética de este tipo de planta micorrizada.

Palabras clave: *Quercus ilex*, *Tuber melanosporum*, simbiosis, diversidad genética, heredabilidad, micorrización.

Temperate forest species often show symbiotic relationships with fungal species through ectomycorrhizae. Some of these symbiotic fungal species have a high culinary and economic value. In some cases, they can be cultivated due to the decrease of wild productions in recent decades. One example is the cultivation of the black truffle (*Tuber melanosporum*) using the holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) as a host tree. This association is achieved by producing the mycorrhized holm oak in a nursery. Currently, it is one of the types of plant with the highest demand, but at the same time it needs to be improved in terms of quality. One of the most demanded quality parameters of this type of plant is the percentage of mycorrhization by this fungal specie. Taking advantage of the knowledge about the genetic basis of Mediterranean forest species, and the existence of successful experiences on mycorrhization with other fungal species at the quantitative genetic level, it was proposed to carry out a study with this binomial species to check if one of the quality improvements of this type of plant could come through the genetic way. Thus, quantitative genetics tools were applied in two experiments. In both, an attempt was made to produce this type of plant under the same environmental and inoculation conditions. In the first one, the variability of this character, and of others (diameter, height, number of total root tips and number of mycorrhized root tips with *T. melanosporum*) was tested, for 5 *Q. ilex* subsp. *ballota* provenances and in the other experiment, the same characters were tested but at the progeny level in two provenances. The existence of significant differences in the percentage of mycorrhization for provenance and progeny factors were found, were reflected in quantitative differentiation between populations, Q_{st} , of 0,28 and narrow-sense heritability, h^2 , of 0,37. These results enable future genetic improvement programs for this type of mycorrhized plant.

Keywords: *Quercus ilex*, *Tuber melanosporum*, symbiosis, genetic diversity, heritability, mycorrhization.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. INTERDEPENDENCIA ENTRE ESPECIES ARBÓREAS Y HONGOS

Desde hace décadas es bien conocida la interdependencia entre un importante porcentaje de las especies superiores de plantas con determinadas especies de hongos. Estos hongos pueden establecer su relación mutualista con la planta viviendo en su interior (endófitos) o desarrollándose en el suelo conectados a la planta por sus raíces (micorrízicos).

Estas relaciones simbióticas hongo micorrízico-planta, se realizan a través de las raíces de las plantas mediante una serie de estructuras conocidas como micorrizas, que conectan a ambos organismos. En estas relaciones simbióticas, ambos organismos salen beneficiados como consecuencia del mutuo intercambio de sustancias. Por la parte que le toca al hongo, éste está encargado de la asimilación y transporte de: agua, nitrógeno (en forma de amonio, nitrato, aminoácidos, péptidos y oligopéptidos), fósforo, potasio, calcio y micronutrientes como el zinc. La planta, sin embargo, se encarga de proporcionar al hongo azúcares y otros metabolitos (Becquer et al., 2019). Últimamente, parece ser que el papel de estos hongos va siendo cada vez más relevante, dado que existen indicios de estar implicados en la asimilación de nutrientes desde la materia orgánica del suelo a través de mecanismos de degradación (Casieri et al., 2013; Courty et al., 2016; Garcia et al., 2016).

De forma general, los hongos micorrízicos se clasifican en función de la morfología de la estructura de intercambio de sustancias con la planta, o sea, de la micorriza. En grandes rasgos, los principales criterios de diferenciación se basan en la forma de disposición del micelio del hongo en las células del córtex de los ápices radiculares. De esta manera, en la naturaleza podemos encontrar: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides, micorrizas ericoides y micorrizas orquidoides (Smith y Read, 2008).

Pese a que solamente el 3 % de las familias de plantas del planeta forman relaciones simbióticas con hongos ectomicorrízicos, casi la totalidad de los géneros de especies leñosas forestales presentan este tipo de micorriza (Smith y Read, 2008). En bosques templados, estas relaciones entre hongos y plantas son de suma relevancia. De hecho, la alta diversidad de especies vegetales de estos ecosistemas ha provocado que la diversidad de los hongos asociados sea también muy abundante (Tedersoo et al., 2012). Esto puede deberse a que en el periodo de enfriamiento de transición Eoceno-Oligoceno, especies de las familias *Fagaceae* o *Pinaceae*, ubicadas en el hemisferio norte, sufrieran una expansión territorial, convirtiéndose éste también un período de especiación fúngica (Bruns et al., 1998). En consecuencia de todo esto, los principales géneros de especies forestales presentes en las regiones templadas a día de hoy, forman ectomicorrizas (Smith y Read, 2008).

1.2. LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS ESPECIES ARBÓREAS

Las especies arbóreas que componen los bosques templados presentan una alta diversidad genética. Esta característica viene promovida por su mecanismo de polinización, que generalmente es por el viento (anemofilia) (White et al., 2002). Este tipo de sistema reproductivo, ha promovido que individuos de la misma especie interactúen genéticamente aun estando situados a largas distancias. Por ejemplo, Robledo-Arnuncio y Gil (2005) pudieron ver cómo había interacción entre individuos de *Pinus sylvestris* a más de 30 km a través del polen en un estudio realizado el centro de la Península Ibérica. Por esta razón, y junto a su sistema de apareamiento cruzado y la selección diversificada, se ha podido demostrar las especies que componen este tipo de bosques tienen una gran diversidad dentro de sus poblaciones, pero sin haber gran diferenciación entre sus poblaciones en cuanto a diferenciación molecular neutra (Petit y Hampe, 2006).

Esto, sin embargo, no quiere decir que no exista diferenciación entre poblaciones para caracteres adaptativos. Al contrario, la observación de diferencias significativas entre poblaciones de especies forestales para muy diversos caracteres fenotípicos es un hecho generalizado (Alberto et al., 2013). Tradicionalmente se ha prestado gran atención a caracteres relacionados con la producción de madera, tales como el crecimiento, la rectitud de fuste, la fenología y la calidad de la madera (Isik y McKeand, 2019). En trabajos con un enfoque más ecológico, también se han estudiado parámetros adaptativos como la reproducción (Santos-del-Blanco et al., 2012), economía de las hojas (Ramírez-Valiente et al., 2014), la resistencia a la sequía (Santini et al., 2018) o mecanismos de defensa (Moreira et al., 2015), entre muchos otros.

1.3. LA ARQUITECTURA GENÉTICA DE CARACTERES RELACIONADOS CON LA INTERACCIÓN DE LAS ESPECIES ÁRBÓREAS CON HONGOS ECTOMICORRÍDICOS

El hallazgo generalizado de diferenciación entre y dentro de poblaciones para prácticamente cualquier variable fenotípica medida en especies de árboles forestales, hace pensar que también sea este el caso para los caracteres relacionados con la interacción entre árboles y hongos. Los ejemplos disponibles en la literatura, sin embargo son aún relativamente escasos y siendo éste aún un campo poco estudiado. Entre los estudios más relevantes, destacan varios realizados aprovechando ensayos de procedencias previamente establecidos, en los que se constató la existencia de diferencias en las comunidades fúngicas de los diferentes genotipos (Gehring et al., 2017; Lamit et al., 2016; Pérez-Izquierdo et al., 2017).

Otros estudios, han intentado profundizar en los mecanismos próximos de esta interacción mediante experimentos en condiciones más controladas. Por ejemplo, Velmala et al. (2013) tras realizar un estudio de micorrización de *Picea abies* en planta de vivero inoculada, sugieren que el componente genético que determina el crecimiento de las raíces y la formación de raíces cortas es significativo en la formación de

interacciones simbióticas. En otros casos, se pudo ver que la variación en la producción de algún metabolito por parte de la planta hospedante fue la que supuso un cambio en la composición de los hongos ectomicorrícicos asociados a la misma (Bonito et al., 2019). En otras, se demostró que la variación de algún nutriente en los tejidos de la planta también influía a nivel de micorrización (Leski et al., 2010), aunque también hubo estudios que exploraron la existencia de variabilidad genética en patrones de adaptación local entre hospedantes y huéspedes (Downie et al., 2020; Hoeksema y Thompson, 2007; Rúa et al., 2018).

En especies de interés agrícola, se ha realizado un mayor esfuerzo para conocer la implicación de variantes alélicas implicadas en simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares (Lehnert et al., 2017). Para el caso de especies forestales, tan sólo se ha publicado un trabajo con clones de *Pinus taeda* en un ensayo de campo, que sugiere la existencia de genes con un efecto importante en la micorrización, explicando entre un 0,13 y un 0,55 de la varianza fenotípica (Piculell et al., 2019). Esta visión, chocaría sin embargo con el bien establecido modelo infinitesimal que gobierna los caracteres fenotípicos continuos. Este modelo postula la existencia de un número grande de variantes alélicas, cada una de ellas con una contribución individual de tamaño muy pequeño en la varianza del carácter objeto de estudio, que también está influida por el ambiente (Falconer, 1989). No existen sin embargo, estudios con un enfoque de genética cuantitativa, que exploren la arquitectura genética de la relación simbiótica entre especies de árboles y hongos micorrícicos de forma individualizada y controlada.

1.4. CASO PARTICULAR DE ESTUDIO: LA INTERACCIÓN A NIVEL DE MICORRIZACIÓN ENTRE *Tuber melanosporum* Y *Quercus ilex* subsp. *ballota*

La asociación simbiótica entre la encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), y la trufa negra (*Tuber melanosporum*) ofrece un caso de estudio particular propicio para desentrañar la arquitectura genética de esta interacción. Por una parte, la encina es una especie forestal mediterránea que alberga altos niveles de diversidad entre y dentro de poblaciones (Lumaret et al., 2008; Ortego et al., 2014). Por otra parte, se han desarrollado protocolos eficientes para inducir la asociación simbiótica entre encinas y trufas en condiciones controladas en vivero.

De hecho, actualmente la encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) micorrizada con trufa negra *T. melanosporum* es una de las especies arbóreas más utilizadas en viverismo como planta micorrizada (Morcillo et al., 2015). Esto se debe al incremento del cultivo de este hongo bajo condiciones controladas, debido a la caída en su producción natural de en los últimos años por al abandono de los bosques, la falta de silvicultura y de ganado; así como por una sobreexplotación del recurso (Reyna, 2012). Sin embargo, en España hasta mediados-finales del S. XX este hongo hipógeo siempre había sido recolectado de forma silvestre, ya que las producciones aún eran elevadas (García-Barreda et al., 2020).

Esta transición en la forma de obtención del recurso micológico se debe a la necesidad de cubrir la demanda mundial actual de *T. melanosporum*. Pese a que las inversiones en las plantaciones sean importantes, a día de hoy es un cultivo rentable, llegando a generar en España 7,5 millones de €/año en la pasada década (Reyna y Garcia-Barreda, 2014). Obviamente, el cultivo controlado de esta especie ha supuesto la generación de una técnica alrededor del mismo, en la que la mejora continua y la investigación son primordiales (Chevalier y Pargney, 2014).

Por ello, entre los factores a tener en cuenta en el momento de establecer una plantación de *T. melanosporum*, se encuentran: la posibilidad de realizar riegos, un suelo adecuado, un clima favorable y la calidad de la planta micorrizada con *T. melanosporum*. Actualmente, un hecho diferenciador en términos de producción entre las plantaciones que se encuentran en fase productiva es el nivel de micorrización de *T. melanosporum* de las plantas en producción. Si como punto de partida se instala en campo una planta con el mayor porcentaje posible de micorizas de *T. melanosporum* (además de cumplir otras condiciones a nivel de planta forestal), las probabilidades de éxito en términos productivos son mayores. Esto se basa en que será esta especie micorrízica la que domine en la rizosfera de las plantas hospedantes, siempre y cuando los cuidados culturales posteriores son los adecuados (De Miguel et al., 2014).

En esta línea, siendo la trufficultura un sector en fuerte crecimiento a nivel mundial y siendo España un referente en el cultivo de *T. melanosporum*, con un incremento de la superficie cultivada de aproximadamente 1000 ha anuales (Reyna y Garcia-Barreda, 2014); es de vital importancia implantar mejoras en la producción de planta. Además, España ya cuenta con el mismo número de viveros productores de este tipo de planta que Francia (Cocina et al., 2013), pese a que este país tenga el doble de superficie plantada (Reyna y Garcia-Barreda, 2014). Esto se traduce una demanda de planta micorrizada en España de en torno a las 300.000 plantas por año, considerando una densidad aproximada de 300 plantas por hectárea.

Por lo tanto, considerando que el conocimiento técnico del cultivo es aun limitado por su escaso recorrido en comparación a otros cultivos, y que existe un auge en la demanda de planta; la calidad de la planta micorrizada con *T. melanosporum* se convierte en uno de los campos con mayor interés a la hora de obtener mejoras a través de la investigación. En consecuencia, aprovechando el conocimiento sobre la base genética de las especies forestales de clima mediterráneo, entre las cuales se encuentra la *Q. ilex* subsp. *ballota*, y la existencia experiencias favorables sobre micorrización con otras especies de hongos a nivel de genética cuantitativa, se planteó realizar un estudio con este binomio de especies para comprobar si una de las mejoras en la calidad de esta planta podría venir por la vía genética.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio se centra en la evaluación de la arquitectura genética de caracteres relacionados con la interacción simbiótica entre la encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) y la trufa negra (*Tuber melanosporum*).

Por ello, se planteó la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar las diferencias entre varias procedencias de encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) para determinados caracteres fenotípicos: diámetro del cuello de la raíz, número de ápices radiculares totales, número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*, porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* y porcentaje de micorrización de hongos contaminantes.
- Evaluar las diferencias entre progenies de encina (*Q. ilex* subsp. *ballota*) para determinados caracteres fenotípicos: altura, diámetro del cuello de la raíz, número de ápices radiculares totales, número de ápices micorrizados con *T. melanosporum* y porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*.
- Estimar, en base a las diferencias entre procedencias y progenies, diferentes parámetros de genética cuantitativa informativos respecto a la arquitectura genética de la relación *Q. ilex* subsp. *ballota* - *T. melanosporum*.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL DE PARTIDA

3.1.1. Material para ensayo de procedencias

Con el objetivo de testar diferentes procedencias de *Quercus ilex* subsp. *ballota*, se seleccionaron distintas fuentes semilleras oficiales a partir del Catálogo Nacional de Materiales de Base para la producción de Material Forestal de Reproducción Identificado (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de fuentes semilleras seleccionadas para el ensayo. Fuente: Catálogo Nacional de Materiales de Base para la producción de Material Forestal de Reproducción Identificado (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2020.

Región de procedencia	Código Fuente Semillera	Código Ensayo	Término municipal	Provincia	UTM X	UTM Y	Huso	Altitud
2. Cuenca Central del Duero	FS-45/02/09/007	PUE	Puentedura	Burgos	450131	4655293	30	863-985
1. Región Galaico-Leonesa	FS-45/01/49/014	VILL	Villadepera	Zamora	736839	4604757	29	650-850
7. Sierras de Ávila y Segovia	FS-45/07/05/023	HOR	La Horcajada	Ávila	290688	4478302	30	960-1120
2. Cuenca Central del Duero	FS-45/02/47/006	CAS	Castroño	Valladolid	314432	4587997	30	700
1. Región Galaico-Leonesa	FS-45/01/49/002	ZAM	Zamora	Zamora	262916	4599307	30	710

El clima asociado a cada una de las fuentes semilleras, así como su disponibilidad en el vivero, fueron criterios para su selección (Tabla 2).

Tabla 2. Datos climáticos característicos de las fuentes semilleras seleccionadas. Fuente: Agencia Estatal de Meteorología Española, 2020.

Código Ensayo	Temperatura media anual (°C)	Temperatura media mes más frío (°C)	Temperatura media mes más cálido (°C)	Temperatura media de mes más cálido y mes más frío (°C)	Precipitación anual TOTAL (mm)	Precipitación verano (3 meses más secos) (mm)
PUE	10,7	2,7	19,5	11,1	523	90
VILL	11,7	3,5	20,8	12,15	493	57
HOR	11,3	3,2	21,2	12,2	484	59
CAS	12,3	4	21,6	12,8	367	54
ZAM	12,3	3,8	21,5	12,65	359	48

De cada fuente semillera se seleccionaron las bellotas maduras, libres de daños por insectos u otros patógenos. Las bellotas fueron tratadas en masa y agrupadas por procedencia. Se realizaron tres pesadas de 100 bellotas cada una con precisión de 0,01

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).

g, con una balanza de precisión COBOS CB Complet para estimar el peso medio de 100 bellotas de cada procedencia.

Las bellotas fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20 % durante 5 minutos y después aclaradas con abundante agua. Posteriormente, fueron secadas al aire durante 24 horas, para ser estratificadas en una cámara frigorífica a unos 4-5 °C hasta enero de 2018

3.1.2. Material para ensayo de progenies

Para la selección del material vegetal de partida, se seleccionaron dos procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Una de ellas se encontraba en el término municipal de Cevico Navero (Palencia-Castilla y León, España) y la otra en el de Galapagar (Comunidad de Madrid, España) (Tabla 3). La selección de las procedencias obedeció a criterios de disponibilidad de bellota.

Tabla 3. Localización de las procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota* seleccionadas para la obtención de bellota para el ensayo de progenies.

Nombre procedencia	T. municipal	Provincia	UTM X	UTM Y	Huso	Altitud
CN	Cevico Navero	Palencia	403704	4635640	30	920
GAL	Galapagar	Madrid	413563	4493545	30	890

La procedencia de Cevico Navero, es un encinar enclavado en un terreno de naturaleza calcárea, con clima es considerado Csa según la clasificación climática de Köppen-Geiger, mientras que la procedencia de Galapagar está dentro de un encinar que se desarrolla sobre un sustrato silíceo, con un clima Cfb para la misma clasificación climática (Tabla 4).

Tabla 4. Datos climáticos característicos de las procedencias seleccionadas. Fuente: Agencia Estatal de Meteorología Española, 2020.

Procedencia	Temperatura media anual (°C)	Temperatura media mes más frío (°C)	Temperatura media mes más cálido (°C)	Temperatura media de mes más cálido y mes más frío (°C)	Precipitación anual TOTAL (mm)	Precipitación verano (3 meses más secos) (mm)
CN	11,6	2,9	20,6	11,75	464	69
GAL	12,3	3,7	22,4	13,05	449	60

En noviembre de 2017, se seleccionaron hasta nueve árboles madre en cada una de estas dos procedencias, guardando una distancia mínima de 30 metros ente sí para minimizar la posibilidad de parentesco (García-Nogales et al., 2016). De cada árbol madre se cogieron hasta 30 bellotas maduras, libres de daños por insectos u otros patógenos. Las bellotas fueron etiquetadas individualmente, proporcionándoles un código identificativo, para ser posteriormente pesadas una a una con precisión de 0,01

Alumno: Iván Franco Manchón

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación: Máster en Ingeniería de Montes

g, en gabinete, con una balanza de precisión COBOS CB Complet. Dado el patrón de polinización anemófilo de la especie y la alta densidad de las masas, se asume una relación de parentesco de medios hermanos en cada progenie.

Las bellotas fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20 % durante 5 minutos y después aclaradas con abundante agua. Posteriormente, fueron secadas al aire durante 24 horas, para ser estratificadas en una cámara frigorífica a unos 4-5 °C hasta enero de 2018.

3.2. PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS MICORRIZADAS

Cabe destacar que el proceso de producción de plántulas micorrizadas, que se describe a continuación, fue idéntico tanto para el ensayo de procedencias como para el ensayo de progenies.

3.2.1. GERMINACIÓN DE BELLotas

Siguiendo el periodo vegetativo de *Q. ilex* subsp. *ballota*, en enero de 2018 se procedió a disponer a germinar las bellotas estratificadas de los dos ensayos. Para ello, se volvieron a desinfectar superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20 % durante cinco minutos y se secaron al aire (García-Barreda et al., 2017). A continuación, bandejas de plástico de 60 alveolos con 220 cm³ de capacidad para producción de planta forestal, que fueron previamente desinfectadas, se rellenaron de perlita. En cada uno de estos alveolos se enterró en perlita una bellota, para facilitar que la raíz principal emergente de crezca con rectitud; así como también poder facilitar su posterior trasplante en el momento de la inoculación. Cada bellota fue etiquetada con un código individual. La disposición de las progenies en las cajas se realizó de forma agregada. (Figura 1).

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).



Figura 1. Disposición de las bellotas de los dos ensayos en semilleros rellenos con perlita para favorecer una correcta germinación.

Estas bandejas fueron introducidas en invernadero y fueron regadas unas 2 o 3 veces por semana, hasta que las plántulas recién germinadas tuvieron un tamaño suficiente como para proceder a su inoculación (Palazon y Barriuso, 2012).

3.2.2. PREPARACIÓN DE INÓCULO

Para la preparación del inóculo se utilizó un lote de trufa compuesto por ejemplares con diversos orígenes. Todos los carpóforos fueron adecuadamente limpiados y desinfectados superficialmente tras su recepción (Palazon y Barriuso, 2012). A todos los ejemplares les fue asignado un número identificativo, de cara a garantizar la trazabilidad de los mismos durante todo el período de preparación del inóculo (Figura 2).

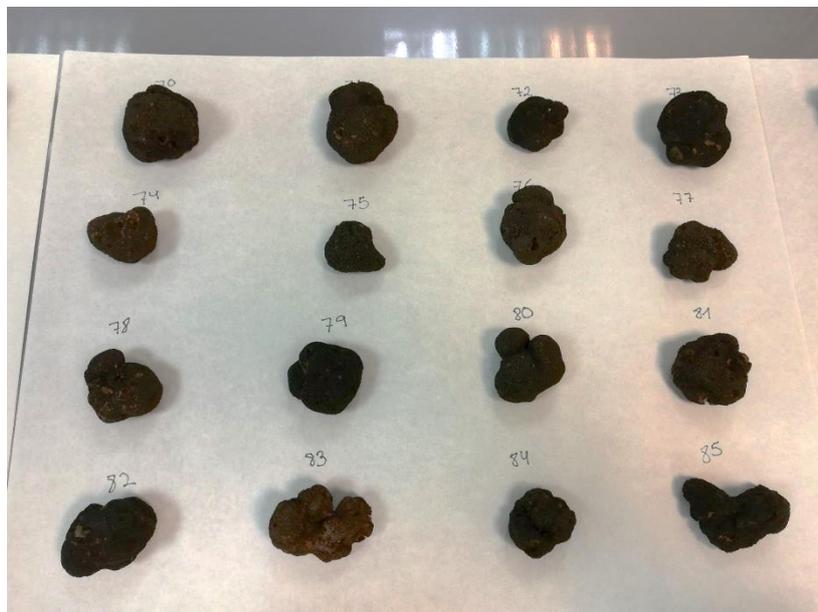


Figura 2. Identificación de los ejemplares de trufa tras ser limpiados y preparados para llevar a cabo el proceso de selección.

Con el fin de asegurar que el inóculo a utilizar es única y exclusivamente de *Tuber melanosporum*, y además presenta una buena calidad en cuanto a madurez, se procedió a llevar a cabo el siguiente proceso de selección:

- 1ª Fase: Descarte de carpóforos que por la morfología de la gleba y el peridio, no coinciden con las características de *T. melanosporum*. Además, en esta fase también se descartaron aquellos carpóforos, que coincidían con las características de *T. melanosporum*, pero que macroscópicamente no presentaban madurez suficiente (Figura 3).



Figura 3. Diferenciación de carpóforos de trufa por su madurez (tonalidad de las venas fértiles de la gleba). Carpóforo inmaduro (izquierda) y carpóforo maduro (derecha).

- 2ª Fase: Los carpóforos que superaron la primera fase fueron sometidos a un análisis microscópico con Motic-BA210. Este análisis consistió en determinar si por la morfología y la disposición de las esporas en las ascas, cada ejemplar analizado se correspondía con *T. melanosporum* o con otra especie similar.
- 3ª Fase: Los carpóforos que superaron la segunda fase, fueron reanalizados en el mismo microscopio para observar la madurez de sus esporas, y poder así seleccionar los ejemplares con la mayor madurez (Figura 4).



Figura 4. Esporas de *T. melanosporum* vistas al microscopio. Imagen izquierda: muestra de esporas inmaduras (mayor transparencia) e imagen derecha: muestra de esporas maduras (mayor opacidad).

- 4ª Fase: Análisis molecular, mediante PCR, de cada uno de los ejemplares seleccionados en la 3ª Fase para corroborar la autenticidad de la especie. La PCR se realizó con el kit IllustratM PuReTaq Ready-To-GoM PCR Beads tubos de 25µl) y los siguientes cebadores específicos multiplex de cada especie: ITS4LNG, ITSB, ITSML y ITSCHCH (Paolocci, 1999). Los controles positivos consistieron en extracciones de ADN de carpóforos de *T. melanosporum*, *T. brumale* y *T. indicum* y se incluyeron en cada lote de amplificaciones. Los amplicones de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con Midori Green y los resultados se visualizaron en un transiluminador UV (Figura 5).



Figura 5. Ejemplo de resultados de gel de agarosa visto al transiluminador UV. 1: escala; 2 a 12: muestras de carpóforos a examinar; 13: control positivo *T. indicum*; 14: control positivo *T. melanosporum*; 15: control positivo *T. brumale* y 16: control negativo.

Una vez seleccionados los ejemplares, se procedió a la producción del inóculo líquido mediante un proceso de trituración mecánica en agua estéril hasta tener un líquido homogéneo con el que inocular las plantas de ambos ensayos.

3.2.3. PREPARACIÓN DE SUSTRATO Y MICORRIZACIÓN

Con el fin de producir un sustrato adecuado, en abril de 2019 se tuvo como referencia la metodología de (García-Barreda et al., 2017). Para ello, se utilizó una mezcla 12:6:1 (v/v) de:

- Suelo calizo arenoso-limoso esterilizado
- Sustrato específico para truficultura TuberGold® de PINDSTRUP. Sustrato elaborado a base de fibra de madera (Forest Gold®), turba y perlita; tiene un pH aproximado de 7,2 y sin fertilizantes añadidos. Además, es un sustrato libre de hongos micorrícicos contaminantes y hongos patógenos
- Arena gruesa de naturaleza caliza esterilizada

Tras conseguir una mezcla homogénea, se procedió a llenar manualmente envases tipo Full-Pot de 450 cm³ (Figura 6).

A continuación, se sacaron las plántulas de la bandeja de germinación y se repicó la raíz pivotante en todas las plántulas, con el fin de estimular la proliferación de raíces secundarias y evitar malformaciones en el futuro que comprometerían la calidad de la planta (Caliskan, 2014). Seguidamente, se inocularon por inmersión en una mezcla de carácter viscoso, 2:1 agua: sacarosa v:p. con el inóculo producido previamente a razón de 2 g de trufa fresca/plántula (o lo que equivale a 6×10^5 esporas/plántula) y fueron transferidas a los contenedores.



Figura 6. Plántula de *Q. ilex* subsp. *ballota* recién inoculada con *T. melanosporum* y trasplantada al envase Full-Pot.

3.3. DISPOSICIÓN, MANTENIMIENTO Y CUIDADO DE PLÁNTULAS MICORRIZADAS EN VIVERO

Tras el trasplante, las plantas fueron llevadas a invernadero con luz natural y buena ventilación. Una vez colocadas las plantas sobre mesas elevadas, se dio un riego de asiento.

El diseño experimental del ensayo de procedencias consistió en cinco bloques completos al azar con tres individuos de cada procedencia por bloque. Respecto a la aleatorización de las posiciones de las plantas, se restringió que dos plantas de una misma procedencia ocuparan posiciones contiguas. Errores humanos en el manejo de las plantas, supusieron la pérdida de las plantas de la procedencia CAS en dos de los bloques y de la procedencia ZAM en tres. El tamaño muestral final fue de $n = 60$ plantas.

El diseño experimental del ensayo de progenies consistió en cuatro bloques al azar, de 35 plantas cada uno. Limitaciones en el número de bellotas por progenie y fallos en la germinación hicieron que el número de individuos por progenie fuera irregular ($n=5-17$). Respecto a la aleatorización de las posiciones de las plantas, se restringió que dos plantas de una misma progenie ocuparan posiciones contiguas. Cada progenie estuvo representada por al menos un individuo en cada bloque. El tamaño muestral fue limitado a $n = 140$ por suponer el límite máximo de evaluación de plantas (Tabla 5).

Tabla 5. Número de individuos (n) por cada progenie y por cada procedencia que compusieron los dos ensayos.

Progenie	n	Procedencia	n
CN1	8	PUE	15
CN2	5	VILL	15
CN3	5	HOR	15
GAL1	12	CAS	9
GAL2	15	ZAM	6
GAL3	17	Total	60
GAL4	14		
GAL5	17		
GAL6	9		
GAL7	13		
GAL8	11		
GAL9	14		
Total	140		

Durante el desarrollo vegetativo, las plantas fueron regadas aproximadamente tres veces por semana durante una hora. Se eliminó la vegetación adventicia periódicamente, y se aplicó el insecticida sistémico CARNADINE® frente a la aparición de pulgón. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta octubre de 2018, momento en que fueron transportadas al laboratorio para su evaluación.

3.4. EVALUACIÓN DE LAS PLÁNTULAS MICORRIZADAS

Todas las plantas fueron sometidas al siguiente proceso de análisis, que estuvo basando en protocolos ya establecidos para el análisis en laboratorio de planta a nivel comercial:

- Eliminación del sustrato del cepellón. Para ello, se colocó cada planta en una cubeta con agua fría y se fue retirando poco a poco el sustrato con el objetivo de preservar las raíces tróficas. Cuando no se pudo quitar más sustrato manualmente, una a una, todas las plantas fueron introducidas en una cubeta de ultrasonidos para poder limpiarlas más a fondo.
- Una vez limpias, se midió la altura (con precisión de mm) del tallo con una regla (solamente las que componían el ensayo de progenies) y diámetro del cuello de la raíz (con precisión de décimas de mm) con calibre digital.
- El sistema radicular de cada planta fue evaluado de manera preliminar a la lupa binocular, con el objetivo de analizar: la abundancia de raíces tróficas, la abundancia y distribución general de las micorrizas, el aspecto general del desarrollo, el color y la morfología de las micorrizas de *T. melanosporum*, la presencia de contaminantes (micorrizas de otros hongos) y la presencia de patógenos de raíz. Como no se encontraron micorrizas de identificación dudosa (otras especies de *Tuber spp.*) no fue necesaria la identificación molecular para descartar la presencia de *T. indicum* y *T. brumale*.
- Una vez evaluadas las plantas de forma preliminar y siendo los resultados positivos, el sistema radicular de cada planta se transfirió a placas Petri para su observación bajo lupa binocular (Motic SMZ-168-BL). Con la ayuda de una plantilla cuadrículada (Figura 7), se estimó de cada planta el número total de ápices y el número de micorrizas correspondientes tanto a *T. melanosporum* como a otros posibles hongos contaminantes. El conteo se realizó de forma individual por cuadrículas, hasta alcanzar un mínimo de 200 ápices observados. La fracción de cuadrículas observadas respecto del total, fue utilizada para extrapolar los números totales de ápices radicales y micorrizas. El porcentaje de micorrizas de *T. melanosporum* se estableció como:

$$\% \text{ micorrizas de } T. \text{ melanosporum} = 100 \times \frac{\text{n}^\circ \text{ de ápices micorrizados con } T. \text{ melanosporum}}{\text{N}^\circ \text{ de ápices totales}}$$



Figura 7. Micorrizas de *T. melanosporum* vistas a la lupa binocular sobre cuadrícula para conteo.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tanto para el ensayo de procedencias como para el de progenies, se ajustaron modelos individuales para cada variable: altura (ensayo de progenies), diámetro, número de ápices, número de micorrizas de *T. melanosporum*, número de micorrizas contaminantes y porcentaje de micorrizas de *T. melanosporum*. El número de micorrizas contaminantes fue transformado tomando logaritmos del valor más uno, debido a la presencia de valores igual a cero. Se asumió una distribución de los errores normal en todos los modelos, incluso para el de porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* sin transformar, a pesar de ser una variable binomial en origen, pues su distribución no difirió de una normal (test de Shapiro-Wilk, $W = 0.9852$, $p = 0.1396$).

En un primer paso, se evaluó la variabilidad entre procedencias y progenies del peso de las bellotas. Para el ensayo de procedencias se usó el siguiente modelo lineal:

$$\text{Peso de 100 bellotas} = \mu + \text{Procedencia} + \text{Error}$$

Siendo μ la media general y teniendo el error residual una distribución normal con media cero. Se evaluó la significatividad del factor procedencia mediante un test de la F, y se procedió a estudiar las diferencias entre las diferentes procedencias con un test post hoc de Tukey.

El peso de las bellotas de las progenies se evaluó mediante el modelo mixto:

$$\text{Peso de la bellota} = \mu + \text{Procedencia} + \text{Progenie}(\text{Procedencia}) + \text{Error}$$

Siendo μ la media general y teniendo el error residual una distribución normal con media cero. Procedencia se definió como factor fijo dado que sólo se disponía de dos niveles (Cevico Navero y Galapagar), mientras que progenie dentro de procedencia se definió como aleatorio. Se evaluó la significatividad del factor procedencia mediante un test de la F, y la significatividad de la progenie con un test de ratios de verosimilitud.

Respecto a los modelos ajustados para las variables medidas en las plantas del ensayo, el peso de la bellota se codificó como variable fija, a efectos de control de los posibles efectos maternos en las variables a estudiar. Bloque y procedencia o progenie dentro de procedencia se definieron como aleatorias respecto a la media. Esta especificación del modelo estuvo justificada en la necesidad de obtener estimaciones de la varianza para los factores aleatorios. Esta especificación, además, se consideró más adecuada dado el número irregular de repeticiones por cada nivel de los factores. En un paso previo, se constató la ausencia de diferencias significativas entre las dos poblaciones del ensayo de progenies para cualquiera de las variables medidas. Consecuentemente, en análisis posteriores la variable procedencia no fue incluida en los modelos del ensayo de progenies.

Los modelos ajustados para los dos ensayos siguieron este patrón:

$$\text{Variable} = \mu + \text{Peso de la bellota} + \text{Bloque} + \text{Procedencia o Progenie} + \text{Error}$$

Siendo μ la media general y teniendo el error residual una distribución normal con media cero. Los modelos fueron ajustados con la función *lmer* del paquete de R (R Development Core Team, 2012) *lmerTest* (Kuznetsova et al., 2017), basado en el paquete *lme4* (Bates et al., 2011). De cada modelo, se evaluó la influencia del peso de la bellota mediante tests de la F con los grados de libertad del denominador calculados mediante la aproximación de Satterwaite (Hrøng-Tai Fai y Cornelius, 1996). Para las variables aleatorias bloque y procedencia o familia, se utilizaron Tests de Ratios de Verosimilitud con pruebas Chi cuadrado. Dichos tests fueron implementados mediante funciones específicas del paquete *lmerTest* (*anova* y *rand*, respectivamente). Todos los modelos fueron validados en cuanto a normalidad y homocedasticidad de los residuales.

Para cada variable aleatoria, se extrajo del modelo información relevante a su varianza asociada, así como el error estándar de la misma. También se obtuvieron los BLUPS (Mejores Predictores Lineales Insesgados) asociados a cada uno de los niveles de las variables procedencia y progenie.

Asumiendo una relación de parentesco de medios hermanos entre los componentes de cada progenie del ensayo de progenies, se utilizó la siguiente fórmula para estimar la heredabilidad:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2} = \frac{4 \times \sigma_{fam}^2}{\sigma_{fam}^2 + \sigma_{error}^2}$$

Donde h^2 es la heredabilidad, σ_A^2 corresponde a la varianza aditiva, σ_p^2 es la varianza fenotípica, σ_{fam}^2 es la varianza asociada al factor progenie para cada variable y σ_{error}^2 es la varianza del error del modelo. Al considerar una relación de parentesco de medios hermanos, con un coeficiente de consanguinidad de 0,25, la relación entre la varianza familiar y la varianza genética aditiva es de 1:4 (Falconer, 1989).

La varianza asociada al factor bloque no fue incluida en el análisis al ser un componente que afecta al fenotipo de forma medible. La interpretación de los resultados está por lo tanto condicionada a esta elección (Santos-del-Blanco et al., 2010).

El coeficiente de varianza genética aditiva se estimó como:

$$CVA = \frac{\sqrt{\sigma_A^2}}{\bar{x}} = \frac{\sqrt{4 \times \sigma_{fam}^2}}{\bar{x}}$$

El coeficiente de diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones (Q_{st}), para el ensayo de procedencias, se estimó a partir de los cálculos de heredabilidad anteriores mediante la fórmula (López et al., 2013):

$$Q_{st} = \frac{\sigma_E^2}{\sigma_E^2 + (2 \times \sigma_D^2)} = \frac{\sigma_{proc}^2}{(2 \times h^2 \times \sigma_{error}^2) + \sigma_{proc}^2}$$

Donde Q_{st} es el coeficiente diferenciación genética cuantitativa entre poblaciones, σ_E^2 es la varianza entre procedencias, σ_D^2 es la varianza dentro de procedencias y σ_{proc}^2 es la varianza asociada al factor procedencia en cada modelo.

Los errores asociados a los parámetros de genética cuantitativa fueron estimados programando funciones específicas para cada parámetro y remuestreando los resultados de los modelos mediante bootstrapping (número de iteraciones = 1000). Para ello, se utilizó la función bootMer (Bates et al., 2011).

Para cada ensayo se calcularon las matrices de correlaciones a nivel fenotípico y entre familias o progenes a partir de datos fenotípicos y BLUPS nivel de procedencia o progenie respectivamente. Se evaluó la significatividad de cada correlación mediante test de la t. Para los datos del ensayo de procedencias, también se exploró la relación entre las estimaciones a nivel de procedencia y los valores de diferentes variables ambientales en su lugar de origen.

Se adjunta el script en el Anexo I.

4 RESULTADOS

4.1. RESULTADOS PRELIMINARES

Como punto de partida en este estudio, se realizó un análisis para determinar si existían diferencias en el peso de la bellota según procedencias y progenies, pudiéndose determinar que sí que existían diferencias significativas y por lo tanto partíamos de un material vegetal diverso (Figuras 8 y 9). Ensayo de procedencias $F_{4,10} 130,2$; $p > 0,001$, ensayo de progenies, $\chi^2 1 54,3$ $p > 0,001$. Sin embargo, no detectamos diferencias significativas en el peso de bellota entre las dos poblaciones muestreadas para el ensayo de progenies $F_{1,11,5} 3,74$; $p = 0,08$, debido a la gran diversidad de pesos medios entre progenies, que llegaron a ser de más del doble para la procedencia de Galapagar.

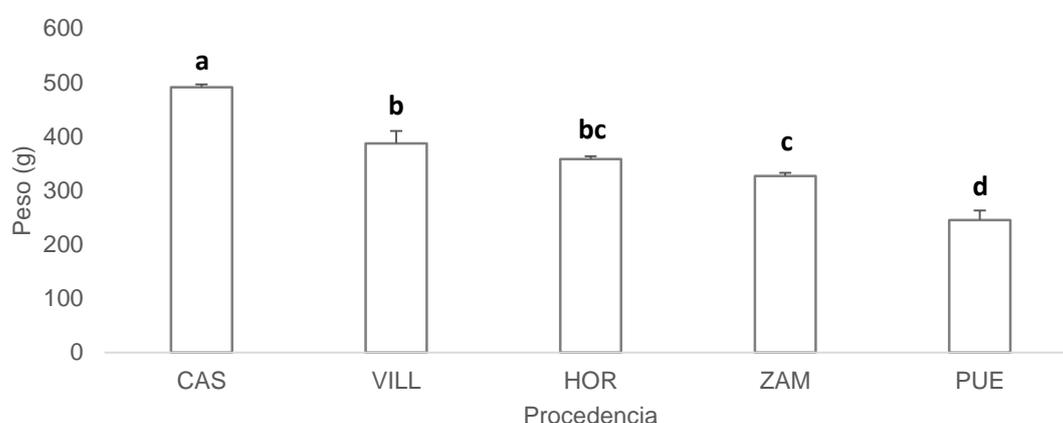


Figura 8. Media del peso de 100 bellotas para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

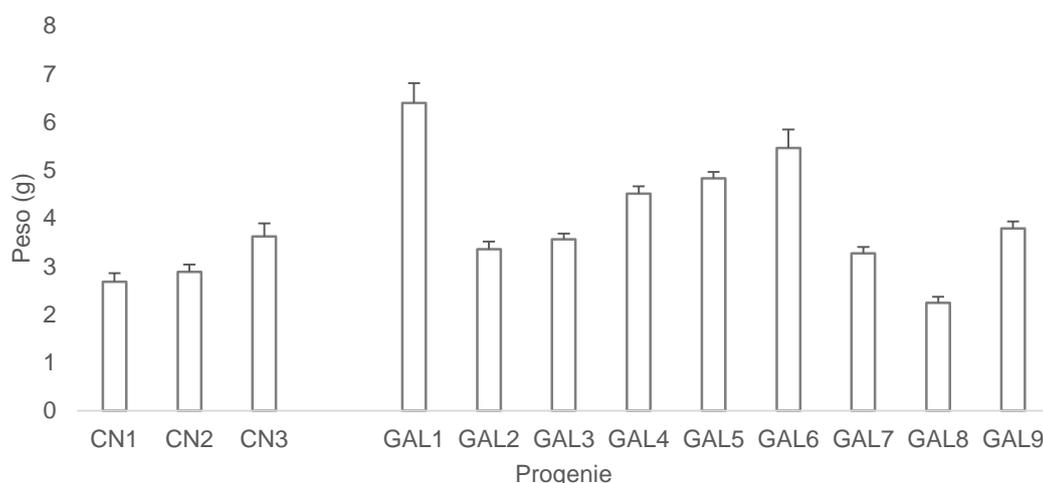


Figura 9. Media del peso de las bellotas para las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

4.2. ENSAYO DE PROCEDENCIAS

Las plantas inoculadas para ensayo tuvieron una tasa supervivencia del 100 % al final del mismo. Además, éstas tuvieron un buen desarrollo radicular y aéreo debido a los exhaustivos cuidados culturales que tuvieron. No se evidenció ningún daño por insectos (u otros animales), ni tumores, ni la presencia de pudriciones u oídio. Tampoco se observaron malformaciones de la parte aérea o ausencia de nuevas yemas.

El diámetro medio del cuello de la raíz (d) del total de plantas analizadas para todas las procedencias ($3,2\pm 0,1$ mm) estaba por encima del mínimo comercial exigido, que es de 2 mm para planta de 1 savia (Real Decreto 289/2003). La procedencia HOR (La Horcajada) destacó frente al resto por tener un 4 % más de diámetro de cuello de la raíz que la procedencia CAS (Castronuño) (Figura 10). No existieron diferencias significativas para este parámetro ni para la variable relativa al peso de la bellota como tampoco para la variable bloque y procedencia (Tabla 6).

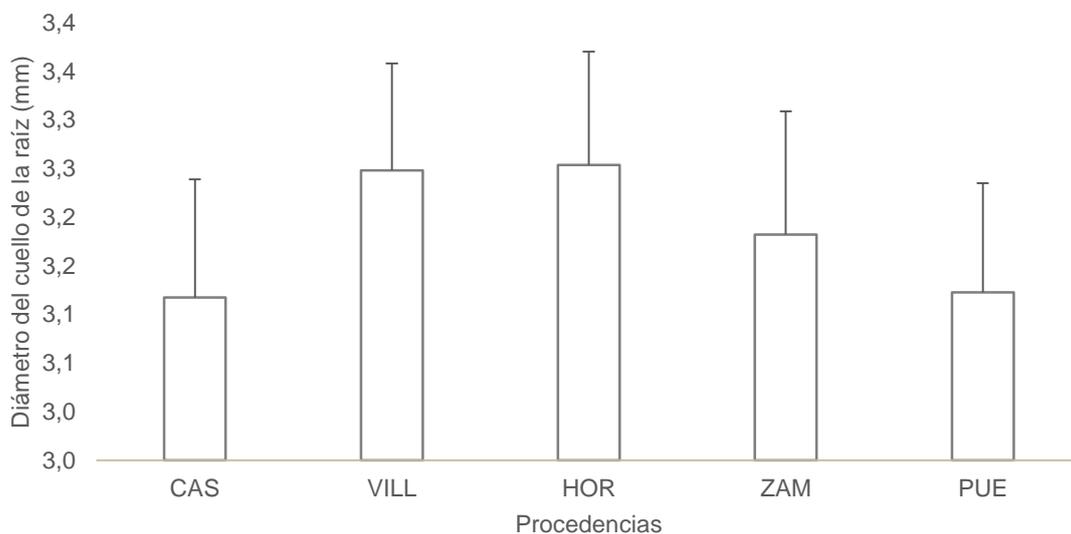


Figura 10. Media del diámetro del cuello de la raíz para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

El número medio de ápices radiculares por planta, observados para todos los ejemplares de todas las procedencias fue de 1623 ± 96 . Existieron unas diferencias del 23% entre la procedencia Villadepera (VILL), que fue la que tuvo mayor abundancia de ápices frente a la procedencia Puentevedra (PUE), que fue la que menos número de ápices tuvo (Figura 11). Se pudo comprobar que no hubo diferencias significativas ni para la variable referente al peso de la bellota, ni para las variables bloque y procedencia (Tabla 6).

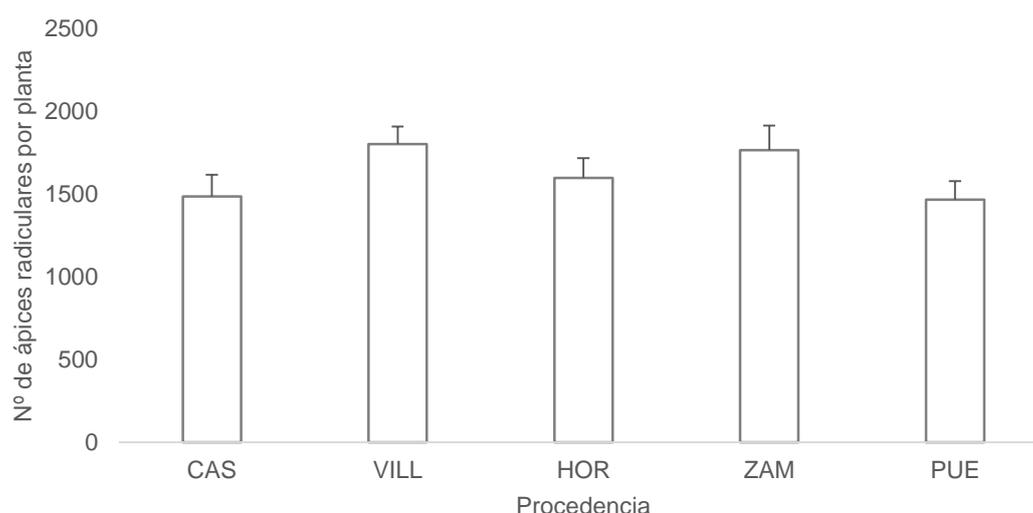


Figura 11. Media del número de ápices por planta para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

En lo referente al número total de ápices micorrizados con *Tuber melanosporum* por planta, el número medio observado en todas las procedencias fue de 303 ± 40 . La procedencia Villadepera (VILL) tuvo más del doble de micorrizas que la procedencia La Horcajada (HOR) (Figura 12). Para este parámetro no se encontraron diferencias significativas para la variable referente al peso de bellota, pero sí para bloque y procedencia (Tabla 6).

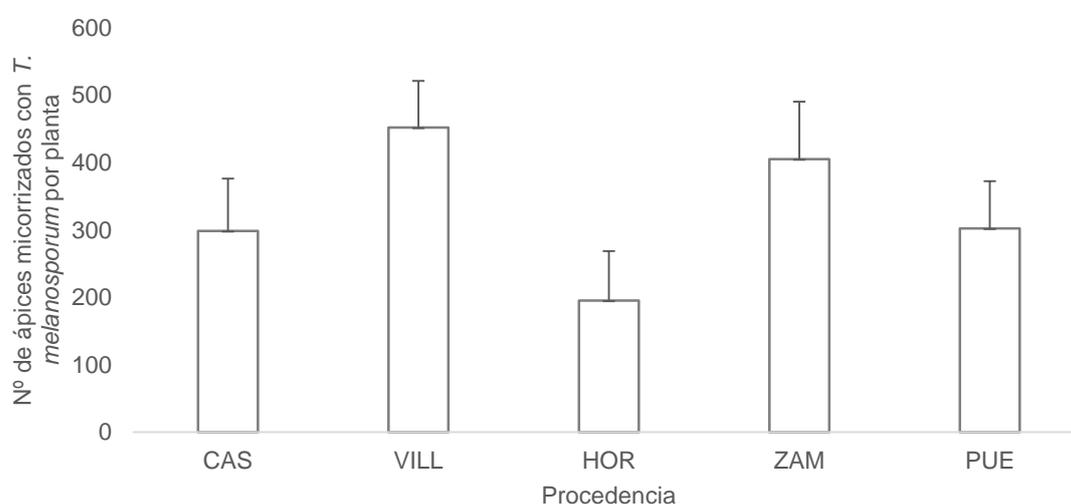


Figura 12. Media del número de ápices micorrizados con *T. melanosporum* por planta para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

El porcentaje medio de ápices micorrizados con *T. melanosporum* por planta para el total de procedencias fue de 19 ± 2 . Se observaron diferencias cercanas al doble entre la procedencia con mayor porcentaje medio de micorrización (VILL-Villadepera) y La Horcajada (HOR), (Figura 13). Para la variable peso bellota, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo para la variable bloque y procedencia, sí (Tabla 6).

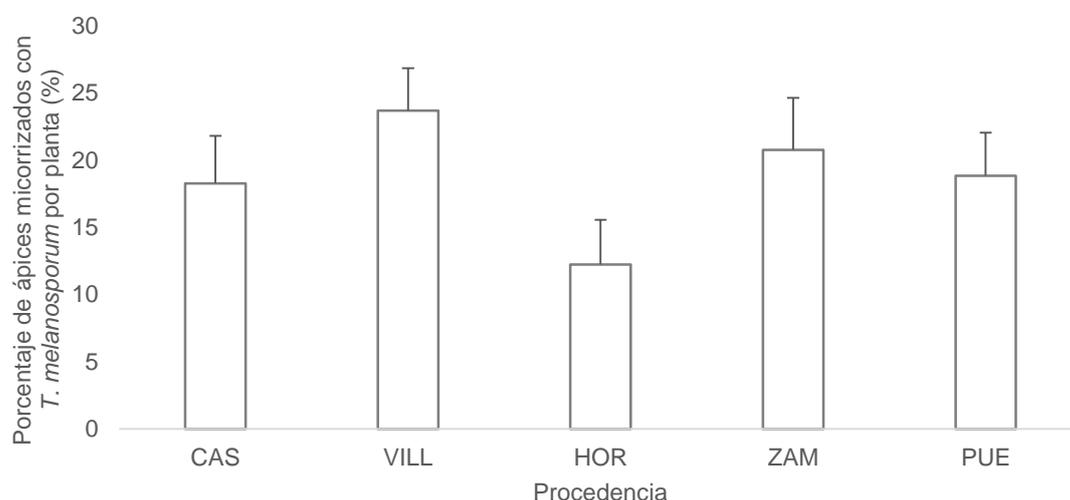


Figura 13. Media del porcentaje de ápices micorrizados con *T. melanosporum* por planta para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

Se observó una baja presencia de micorrizas formadas por otras especies de hongos ectomicorrícicos. La principal especie contaminante detectada fue *Sphaerospora brunnea*. Esta especie es muy frecuente en la planta micorrizada de vivero de 1 y 2 savias, pero no origina problemas de producción en plantaciones adultas. Hubo diferencias de más del doble entre la procedencia con mayor y menor porcentaje de micorrizas contaminantes (Figura 14). No hubo diferencias significativas para esta variable en cuanto al peso de la bellota, el efecto del bloque o la procedencia (Tabla 6).

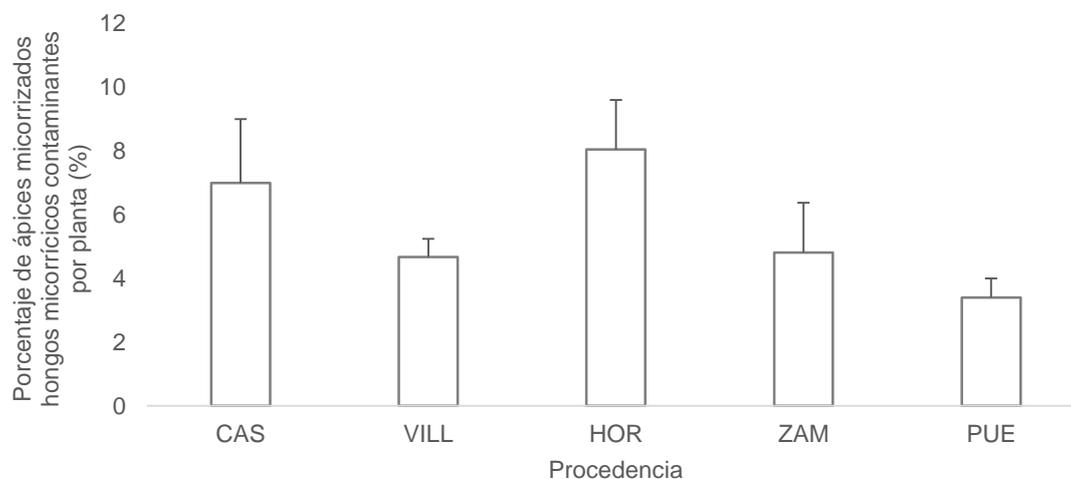


Figura 14. Media del porcentaje de ápices micorrizados con hongos micorrícicos contaminantes por planta para las cinco procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota*. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 1 para descripción de los códigos.

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).

Tabla 6. Resultados relativos a la aplicación de modelos mixtos en función de: peso bellota, bloque y procedencia. En negrita valores significativos (p valor <0,05).

	Peso bellota						Bloque			Procedencia		
	SumCuad	CuadMed	Numgl	Dengl	F.valor	Pr(>F)	Chi.sq	gl	p.valor	Chi.sq	gl	p.valor
Diámetro	0,68	0,68	1	2,96	1,30	0,34	0,00	1	1,00	0,22	1	0,60
Nº Tot. Ápices	54342,00	54342,00	1	2,96	0,25	0,65	0,39	1	0,53	3,21	1	0,07
Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	8917,00	8917,00	1	3,07	0,19	0,69	22,00	1	<0,01	6,67	1	0,01
% Mico. <i>T. melanosporum</i>	20,04	20,04	1	3,16	0,18	0,70	25,41	1	0,01	5,28	1	0,02
% Mico. Hongos Cont.	0,95	0,95	1	3,13	2,40	0,22	0,00	1	1,00	1,15	1	0,30

A nivel de correlaciones fenotípicas, se han podido encontrar asociaciones significativas entre todas las variables excepto para el diámetro y el porcentaje de micorrización con *T. melanosporum*, y entre el número de ápices micorrizados con contaminantes y el diámetro y número total de ápices, respectivamente.

A nivel de correlaciones entre procedencias, también se encontró una fuerte correlación, en parte probablemente espúrea, entre el número total de micorrizas de *T. melanosporum* por planta y el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* por planta (Tabla 7).

Tabla 7. Correlaciones a nivel fenotípico y entre procedencias para cada una de las variables medidas en el ensayo de procedencias. En negrita se indican valores de coeficientes significativos (p valor <0,05).

	-----FENOTÍPICAS-----				
	Diámetro	Nº Tot. Ápices	Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	% Mico. <i>T. melanosporum</i>	% Mico. hongos Cont.
Diámetro	X	0,60 (0,00)	0,32 (0,01)	0,17 (0,20)	-0,06 (0,65)
Nº Tot. Ápices	0,69 (0,20)	X	0,59 (0,00)	0,33 (0,01)	-0,14 (0,31)
Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	0,08 (0,90)	0,72 (0,17)	X	0,93 (0,00)	-0,36 (0,01)
% Mico. <i>T. melanosporum</i>	-0,11 (0,87)	0,53 (0,36)	0,97 (0,01)	X	-0,38 (0,00)
% Mico. hongos Cont.	0,57 (0,32)	-0,05 (0,93)	-0,74 (0,16)	-0,87 (0,05)	X
	-----ENTRE PROCEDENCIAS-----				

4.3. ENSAYO DE PROGENIES

Para la variable altura, el valor medio para el total de observaciones realizadas en todas las progenies fue de $9,9 \pm 0,3$ cm (Figura 15). Existieron unas diferencias del 46 % entre la progenie con menor y mayor media en altura ($8,2 \pm 0,6$ mm y $12,0 \pm 0,7$ mm). No existieron diferencias significativas para esta variable en lo que concierne al peso de la bellota. Sí que existieron diferencias significativas para la variable familia y bloque (Tabla 8).

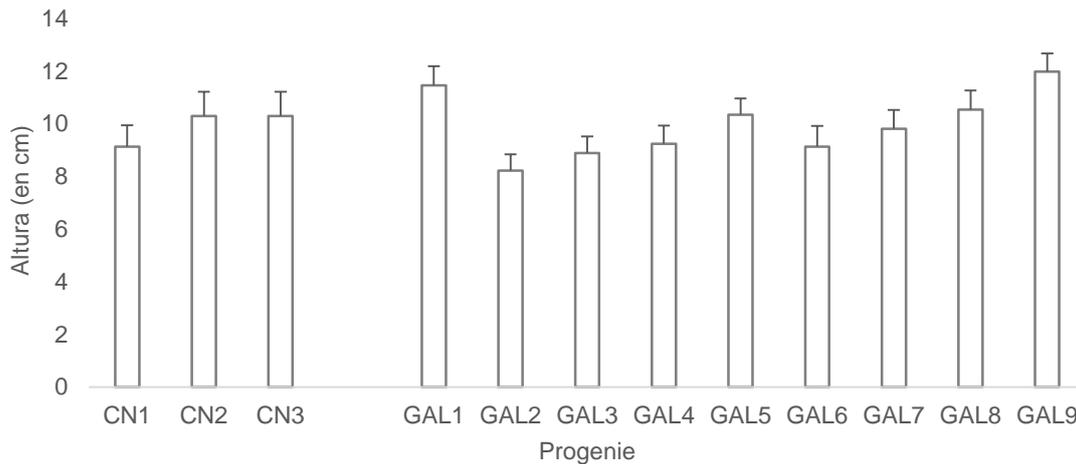


Figura 16. Media de la altura (en cm) para cada una de las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

La media de la variable diámetro para el conjunto de muestras analizadas de todo el ensayo fue $3,0 \pm 0,1$ mm. Las diferencias entre la progenie con mayor y menor diámetro medio fueron del 18 % (Figura 16). El peso de la bellota, del bloque y de la familia sí que tuvieron efectos significativos (Tabla 8).

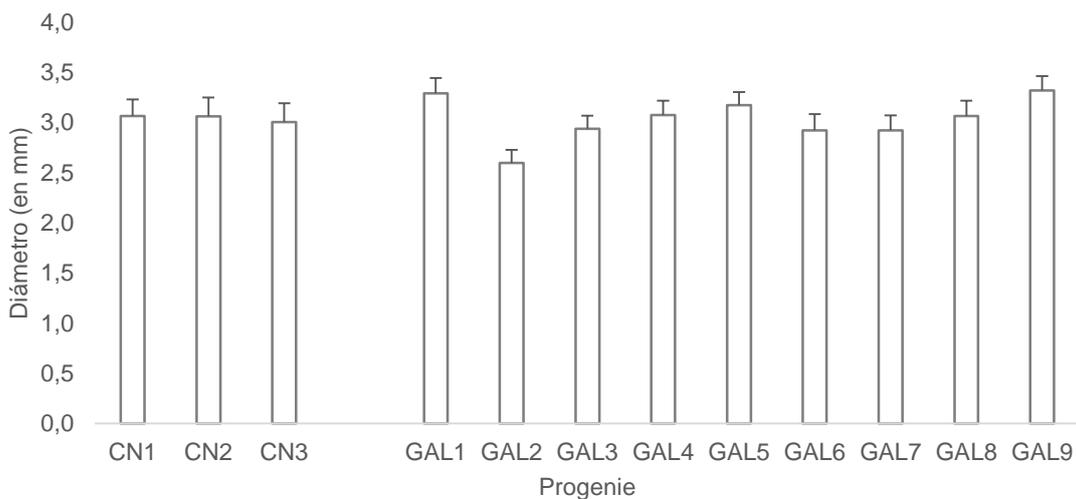


Figura 15. Media del diámetro (en mm) para cada una de las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

En lo que se refiere al número total de ápices radiculares por planta, se pudo observar que la media del ensayo se situó en 1721 ± 74 . Las diferencias entre la progenie con mayor y menor número de ápices radiculares por planta fueron del 13 % (Figura 17). No se apreciaron diferencias significativas para este parámetro, ni para la influencia del peso de la bellota ni para el efecto de la familia. Sí que se encontraron diferencias significativas para el efecto del bloque (Tabla 8).

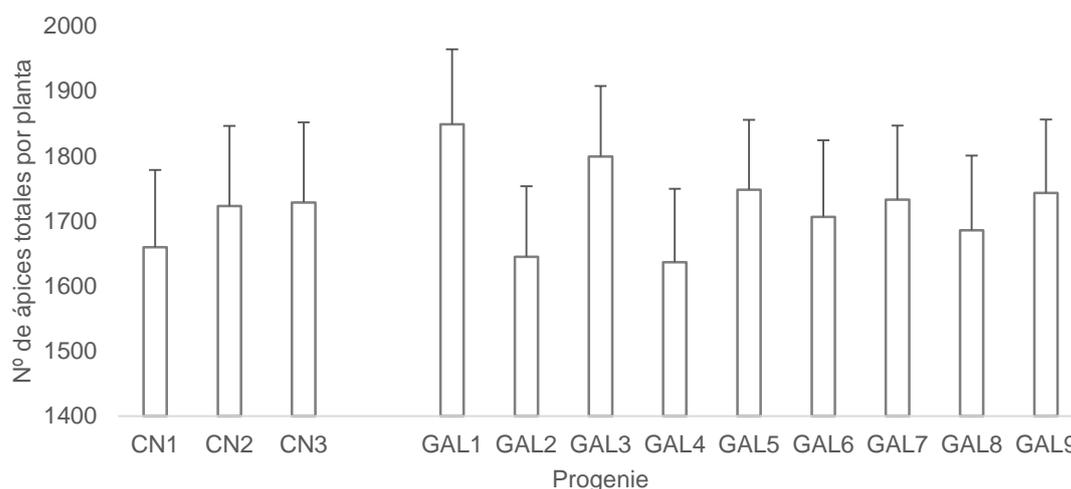


Figura 17. Media del número de ápices radiculares totales por planta para las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

El número medio de micorrizas de *T. melanosporum* por planta para el total de plantas del ensayo, fue de 760 ± 42 . Las diferencias entre las progenies con más y con menos micorrizas de *T. melanosporum* por planta fueron del 21 % (Figura 18). No existieron diferencias significativas para esta variable en relación al efecto del peso de la bellota y de la familia. Sí que se encontraron para el factor bloque (Tabla 8).

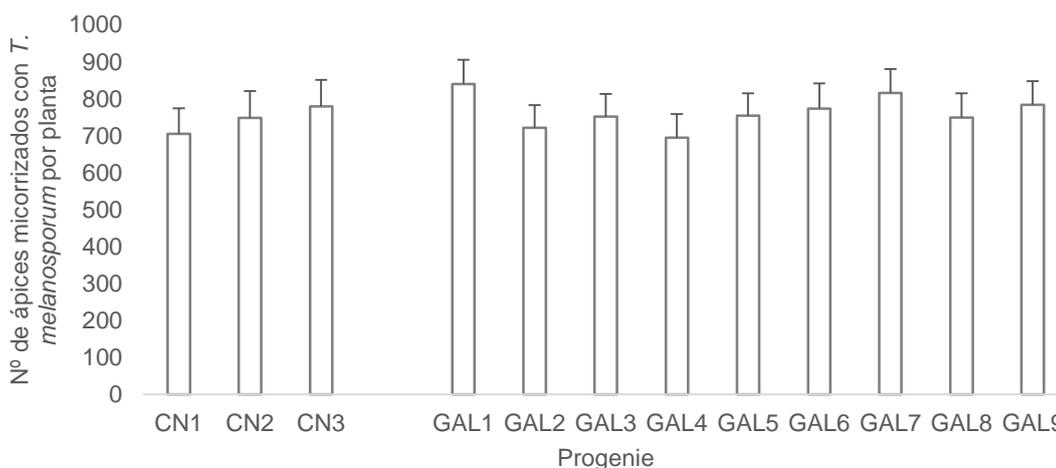


Figura 18. Media del número de ápices micorrizados con *T. melanosporum* por planta para las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).

En relación al porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* por planta, la media del ensayo se situó en un 42 ± 1 . Las procedencias GAL7 y GAL3 distaron en un 21 %, siendo éstas las que mayor y menor porcentaje presentaron, respectivamente (Figura 19). Se pudieron ver diferencias significativas para la variable familia y bloque, no siendo así para la variable relativa al peso de la bellota (Tabla 8).

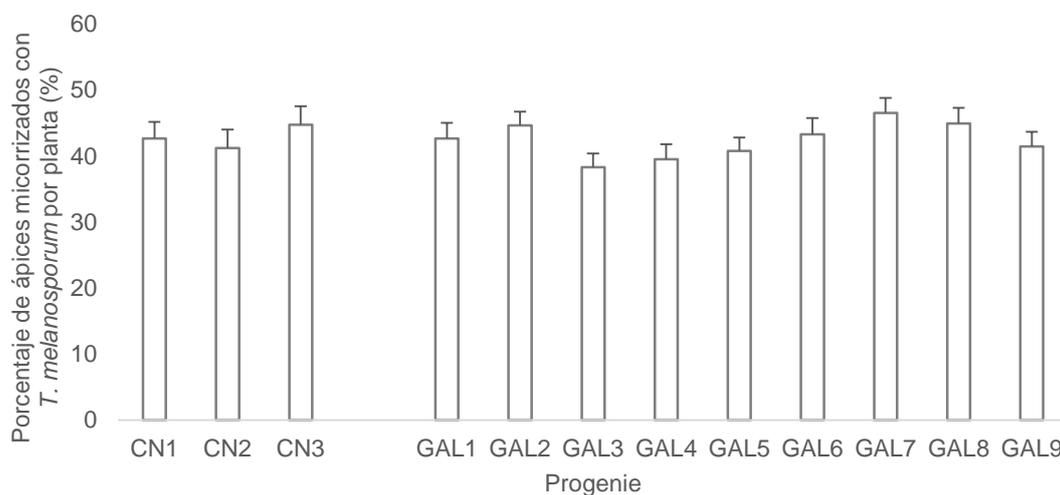


Figura 19. Media del porcentaje de ápices micorrizados con *T. melanosporum* por planta para las doce (3+9) progenies de *Q. ilex* subsp. *ballota*, agrupadas según su procedencia. Las barras de error indican error estándar. Ver Tabla 4 para descripción de los códigos.

Tabla 8. Resultados relativos a la aplicación de modelos mixtos en función de: peso bellota, bloque y progenie; para las variables medidas. En negrita valores significativos (p valor $< 0,05$).

	Peso bellota						Bloque			Progenie		
	SumCuad	CuadMed	Numgl	Dengl	F.valor	Pr(>F)	Chi.sq	gl	p.valor	Chi.sq	gl	p.valor
Altura	13,47	13,47	1	94,98	1,61	0,21	13,5	1	0,00	12,70	1	0,00
Diámetro	2,54	2,545	1	84,11	6,18	0,01	6,76	1	0,01	8,81	1	0,00
Nº Tot. Ápices	2036464	2036464	1	43,48	3,22	0,08	15,06	1	0,00	0,40	1	0,50
Nº Tot. Micorizas <i>T. melanosporum</i>	9160	91560	1	42,65	0,06	0,81	45,65	1	0,00	0,63	1	0,40
% Mico. <i>T. melanosporum</i>	195	195	1	67,48	1,69	0,20	61,11	1	0,00	4,16	1	0,04

Se encontraron asociaciones significativas entre todas las combinaciones de variables, excepto para el porcentaje de micorrización con *T. melanosporum* y los parámetros de tamaño, altura y diámetro; respectivamente. Las correlaciones fenotípicas significativas más fuertes fueron la de la variable altura, con respecto al diámetro; así como también la que implica al número total de micorizas de *T. melanosporum* con

Estudio de la base genética cuantitativa de la micorrización de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) con trufa negra (*Tuber melanosporum*).

respecto al número total de ápices por planta y, también, con respecto al porcentaje de ápices micorrizados de *T. melanosporum* por planta (Tabla 9).

En cuanto a las correlaciones entre estimaciones a nivel de familia, hubo una correlación significativa notable entre el número total de micorrizas de *T. melanosporum* por planta respecto a la altura y al número total de ápices. De igual manera, ocurrió entre la altura y el diámetro (Tabla 9).

Tabla 9. Correlaciones a nivel genético y entre familias para cada una de las variables medidas en el ensayo de progenies. En negrita indican valores de coeficientes significativos (p valor $<0,05$).

-----FENOTÍPICAS-----					
	Altura	Diámetro	Nº Tot. Ápices	Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	% Mico. <i>T. melanosporum</i>
Altura	x	0,68 (0,00)	0,35 (0,00)	0,18 (0,03)	-0,13 (0,11)
Diámetro	0,85 (0,00)	x	0,34 (0,00)	0,17 (0,03)	-0,14 (0,09)
Nº Tot. Ápices	0,53 (0,07)	0,48 (0,11)	x	0,82 (0,00)	0,21 (0,01)
Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	0,60 (0,03)	0,35 (0,26)	0,79 (0,00)	x	0,67 (0,00)
% Mico. <i>T. melanosporum</i>	0,02 (0,94)	-0,34 (0,28)	-0,20 (0,52)	0,35 (0,26)	x
-----ENTRE FAMILIAS-----					

4.4. PARÁMETROS DE GENÉTICA CUANTITATIVA

En lo que respecta a la heredabilidad (h^2), las variables altura, diámetro y porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* han sido las que han presentado valores más altos. Los errores fueron importantes para todas las variables, siendo mayores que las propias estimaciones para las variables referentes al número total de ápices y número de micorrizas *T. melanosporum*. La evolvabilidad (CVa) más alta la presenta la altura y el número total de micorrizas de *T. melanosporum*. El índice Q_{st} , indica que tanto para el número total de ápices como para el número total de micorrizas de *T. melanosporum* la diversidad genética cuantitativa está repartida equitativamente entre y dentro de poblaciones. Los errores asociados a estas estimaciones también fueron importantes (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de parámetros de genética cuantitativa resultantes de los dos ensayos.

	h^2	CVa	Q_{st}
Altura	0,71 (0,37)	26,8 (9,2)	-
Diámetro	0,52 (0,31)	16,3 (6,4)	0,03 (0,07)
Nº Tot. Ápices	0,11 (0,18)	15,3 (12,0)	0,50 (0,27)
Nº Tot. Micorrizas <i>T. melanosporum</i>	0,15 (0,18)	20,8 (14,1)	0,55 (0,26)
% Mico. <i>T. melanosporum</i>	0,37 (0,27)	16,1 (7,7)	0,28 (0,19)

5 **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

En ese estudio se ha podido demostrar la existencia de diferencias significativas entre y dentro de procedencias, para caracteres relacionados con la simbiosis entre una especie de árbol forestal y un hongo ectomicorrícico. Además, gracias al diseño experimental que integraba individuos emparentados en calidad de medios hermanos, han podido estimarse parámetros que confirman la posibilidad de realizar un programa de mejora genética en *Quercus ilex* subsp. *ballota*. De esta forma, los resultados de ambos experimentos han podido confirmar las hipótesis de partida. Este es el primer trabajo experimental que comprueba tales hipótesis a nivel mundial de forma conjunta, teniendo además el valor añadido del interés económico de la relación entre *Q. ilex* subsp. *ballota* y *Tuber melanosporum*.

5.1. **VARIACIÓN ENTRE Y DENTRO DE PROCEDENCIAS**

El provisionamiento materno en forma de nutrientes en las semillas puede aportar ventajas competitivas (Uscola et al., 2015). De esta forma, a igualdad de otros parámetros, las semillas de mayor tamaño podrán tener un mayor crecimiento inicial. En tanto en cuanto este crecimiento inicial contribuya a dar una ventaja inicial a los individuos, las semillas más grandes darán lugar a plántulas también de mayor tamaño. Por este motivo, en viverismo se tiende a realizar una selección de las semillas, eliminando las de menor tamaño (Villar-Salvador et al., 2013). En *Q. ilex* subsp. *ballota*, en particular, estas diferencias en tamaño llegan ser importantes (García-Nogales et al., 2016). En el ensayo de procedencias, sin embargo, no se observó que el peso de la bellota tuviera ningún efecto sobre los caracteres medidos. Por el contrario, en el ensayo de progenies, sí se observó una influencia significativa ($p = 0,02$) del peso de la bellota en el diámetro de las plantas, no así en la altura. La relación con el número de ápices también estuvo próxima a la significatividad ($p = 0,08$). La falta de una asociación fuerte entre el tamaño de la bellota, a pesar de existir un rango muy amplio de tamaños en nuestros ensayos, puede guardar relación con la práctica del repicado en el procesamiento de las plantas. A pesar de que la bellota permaneció unida a la planta tras el procesado, el corte de la raíz puede estar creando una uniformización de las plantas. De esta forma las diferencias que se esperarían observar en las plantas en relación con el tamaño de la bellota, quedarían en parte diluidas por esta práctica. En conclusión, en base a los resultados observados, cabe esperar ciertas mejoras en la calidad forestal de las plantas procedentes de bellotas de mayor tamaño dentro de una misma procedencia. Esta conclusión, sin embargo, debería ser explorada en más profundidad en estudios futuros.

Los efectos de la heterogeneidad espacial, en forma de efectos del bloque, fueron muy diferentes en cada experimento. En el ensayo de procedencias, el efecto bloque tan sólo fue significativo para las variables número total de micorrizas y porcentaje micorrización con *T. melanosporum*. Sin embargo, en el ensayo de progenies, de mayor tamaño, el efecto bloque fue significativo para cada una de las variables estudiadas. En

investigación, un adecuado diseño experimental y aleatorización son de fundamental importancia a la hora de implantar ensayos comparativos, incluso en condiciones aparentemente controladas como pueden ser las de un invernadero. Nuestros resultados, aún sin poder explicar con precisión la causa de la discordancia entre ambos ensayos, confirma este hecho también para variables relativamente poco estudiadas a este nivel como son las relaciones simbióticas entre árboles y hongos. Además, el estudio de la heterogeneidad espacial a escala fina, puede aportar valiosos indicios sobre factores ambientales que tengan una relación directa con la calidad de la planta (Mollá et al., 2006; Palacios et al., 2009).

En términos de morfología de la plántula, los diámetros del cuello de la raíz fueron muy uniformes entre procedencias, variando tan sólo un 4% entre las más extremas. Este hallazgo contrasta con el rango de tamaños de bellota entre procedencias. Como se hipotetizó anteriormente, quizás el sometimiento de las plantas al repicado de la raíz, tuvo efectos en forma de uniformización de las plantas, en este caso, a nivel de procedencia (Andivia et al., 2012; Caliskan, 2014). En el ensayo de progenies, sin embargo, sí se observaron importantes diferencias de tamaño entre las mismas, de cerca del 50% en altura y 20% en diámetro. Para el caso del diámetro, las diferencias pudieron estar contribuidas en parte por efectos maternos de provisión en forma de peso de la bellota (Alonso-Crespo et al., 2020). No así en el caso de la altura, para lo que habría que buscar explicaciones en factores relacionados con la capacidad intrínseca para el crecimiento de cada procedencia.

Las diferencias morfológicas entre procedencias y progenies fueron elusivas respecto al número total de ápices por planta, variable indicadora del desarrollo radical. A pesar de observarse diferencias de hasta un 23 % entre procedencias para esta variable, los modelos estadísticos indicaron que las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, este rango de variación está en consonancia con las diferencias encontradas para otras procedencias (Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007). Por otra parte, en ambos estudios se han encontrado fuertes correlaciones positivas (coeficientes de correlación de 0,59 y 0,82, ensayo de progenies y ensayo de procedencias, respectivamente) entre el número de ápices radicales en la planta y el número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*. Las correlaciones con el porcentaje de micorrización también fueron positivas y significativas aunque de menor intensidad (0,33 y 0,21, respectivamente). Esto implica, que a nivel individual, las plantas que presentan un desarrollo radical superior, también tienen un mejor porcentaje de micorrización. Esta observación puede extenderse también a nivel de progenie, dada una correlación positiva a este nivel (0,79), pero no a nivel de procedencia.

La relación entre las variables número total de ápices micorrizados con *T. melanosporum* y porcentaje de micorrización con *T. melanosporum* está mediada por el número total de ápices radicales. Cabe esperar por lo tanto una relación más o menos estrecha entre ambas variables, debido a causas espúreas. Existe sin embargo un cierto margen para la variabilidad si el número de micorrizas no es un resultado directo del número total de

ápices radicales. Los resultados de ambos ensayos muestran importantes efectos genéticos, tanto a nivel de procedencias como a nivel de progenie para el porcentaje de micorrización. El número total de ápices micorrizados, sin embargo, sólo mostró diferencias significativas para el caso del ensayo de procedencias. A nivel de correlaciones entre procedencias, la relación entre ambas variables fue casi perfecta (0,97). Esto indicó por consiguiente, la ausencia de variabilidad entre procedencias para la relación entre el número de micorrizas y el número total de ápices radicales. A nivel de progenies, sin embargo, los resultados indican la existencia de variabilidad genética dentro de procedencias para el porcentaje de micorrización, de forma independiente al número total de ápices radicales. Esto es, a pesar de observarse correlaciones positivas a nivel fenotípico entre, por un lado el número de ápices radicales y el número de ápices radicales micorrizados y por otro, el porcentaje de micorrización, estas correlaciones no se replicaron a nivel genético (entre progenies).

5.2. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA SIMBIOSIS ÁRBOL - HONGO

Q. ilex subsp. *ballota*, es una especie cuya diversidad genética ha sido relativamente poco estudiada, en comparación con otras especies de coníferas, a pesar de su vital importancia ecológica en ambientes mediterráneos. Esta escasez de trabajos tanto a nivel molecular neutro, como de caracteres fenotípicos adaptativos, dificulta las posibles comparaciones de los resultados de este estudio. Sí existen sin embargo algunos estudios centrados en el estudio de factores que afectan a la calidad de la planta producida en vivero con fines de reforestación, que en términos generales coinciden con los resultados observados en este estudio (Andivia et al., 2012; Caliskan, 2014; García-Nogales et al., 2016; Palacios et al., 2009; Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007; Valero Galván et al., 2012; Villar-Salvador et al., 2012, 2010, 2004). Una posible comparativa la ofrecen otras especies de *Quercus* mediterráneos, entre los que destaca el alcornoque, *Q. suber* por compartir hábitats similares y ser compatible sexualmente. Para esta especie se han descrito extensos patrones ecotípicos para caracteres adaptativos, al mismo tiempo que muestra un reparto de la diversidad genética principalmente dentro de las poblaciones. En concreto, se han reportado valores de diferenciación molecular neutra, estimada con microsatélites, F_{st} de $0,032 \pm 0,003$ para poblaciones de la Península Ibérica (Ramírez-Valiente et al., 2009). Los valores de Q_{st} y h^2 para el diámetro basal fueron de 0,07 y 0,37, próximos a los valores encontrados en este estudio (0,03 y 0,52, respectivamente). La comparación de los valores de Q_{st} con los de F_{st} , permite inferir la existencia de fuerzas selectivas divergentes entre poblaciones. En este estudio, los resultados observados sugieren que las variables número total de ápices radicales, número total de ápices micorrizados con *T. melanosporum* y porcentaje de micorrización con *T. melanosporum*, o bien otras variables correlacionadas con ellas, han estado sujetas a la acción de presiones selectivas divergentes entre las diferentes poblaciones estudiadas. El diámetro del cuello de la raíz, sin embargo, no cumpliría este criterio.

A pesar de la especificidad de este estudio, a nivel de interacción específica entre una especie de árbol y una especie de hongo simbionte, no cabe deducir que los caracteres estudiados hayan sido objeto de selección natural directa. De hecho, varias de las procedencias de *Q. ilex* subsp. *ballota* ensayadas provienen de áreas fuera del rango de distribución de *T. melanosporum* (por ejemplo, Zamora, o Galapagar). Esta observación, vendría a contradecir la hipótesis de adaptación local en las relaciones huésped hospedante, para el caso concreto de *Q. ilex* subsp. *ballota* y *T. melanosporum* (Hoeksema et al., 2018; Rúa et al., 2018, 2016).

La explicación más probable para la existencia de variación genética entre y dentro de poblaciones es, por lo tanto, la existencia de caracteres intermedios correlacionados con los estudiados. El estado actual de la investigación en variabilidad genética de la micorrización de especies forestales con hongos ectomicorrícicos, no permite por el momento aventurar estas causas próximas. Sí se va a acumulando sin embargo, cierta evidencia de la importancia de este fenómeno, normalmente estudiado a nivel de comunidad fúngica (Lang et al., 2013) aunque también a nivel específico (Piculell et al., 2019). Diferentes estudios dan estimaciones muy dispares del porcentaje de varianza fenotípica explicada por causas genéticas. Desde una heredabilidad en sentido amplio (H^2) de 0,032 para el porcentaje de micorrización de *Populus angustifolia* con hongos ectomicorrícicos (Lamit et al., 2016), o de entre 0,04 y 0,11 en la asociación entre *Picea abies* y varias especies ectomicorrícicas (Velmalá et al., 2013), hasta una un rango de entre 0,13 y el 0,55 para el porcentaje de varianza fenotípica explicada en un estudio de asociación molecular entre *Pinus taeda* y diferentes hongos simbiontes (Piculell et al., 2019). El valor de heredabilidad en sentido estricto (h^2) observado en el presente estudio para la asociación entre de *Q. ilex* subsp. *ballota* y *T. melanosporum* fue de 0,37, situándose en medio del rango de variación reportado por (Piculell et al., 2019) y superior al del resto de trabajos revisados. Sin embargo, dado el diseño experimental de estos estudios, que incluían diferentes clones, estos valores, podrían estar inflados por efectos genéticos dominantes.

Más directamente comparable con el presente, es el estudio pionero de Rosado et al., (1994) quienes estudiaron la micorrización de varias progenies de *Pinus elliotii* con *Pisolithus tinctorius*. En este estudio se estimó una heredabilidad en sentido estricto de 0,81 aunque este valor pudo estar muy influido por la existencia de una familia de comportamiento anómalo y no se reportaron errores para la estimación de la heredabilidad. Más recientemente, se han publicado datos sobre la heredabilidad en sentido estricto de la respuesta a la micorrización, en progenies de *Pinus sylvestris* en Escocia (Downie et al., 2020). Los valores variaron entre 0,27 para la respuesta medida en el ratio parte aérea:parte radical, y 1,05 para la respuesta medida como biomasa. En su conjunto, la evidencia disponible por el momento, y confirmada por el presente estudio, apunta a la existencia de importantes efectos genéticos tanto entre como dentro de poblaciones para diferentes caracteres implicados en la relación simbiótica entre de árboles forestales y hongos ectomicorrícicos.

5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En términos generales, cabe destacar que todas las plantas inoculadas prosperaron adecuadamente estando libres de daños, de patógenos y de malformaciones; obteniéndose una planta micorrizada de una buena calidad. Pese a ello, también es importante indicar que el experimento tuvo una serie de limitaciones en cuanto al tamaño de las familias y las procedencias. El procesado de las muestras es muy laborioso y supone un cuello de botella a la hora de plantear este tipo de experimentos, teniendo un impacto negativo en la precisión con la que puedan estimarse diferentes parámetros y la influencia de diferentes factores. Quizás, la búsqueda de un método abreviado de análisis de planta que arroje resultados igualmente robustos y permita realizar futuros ensayos más ambiciosos.

Un aspecto potencialmente criticable de la aplicación de la mejora genética a la planta de encina micorrizada con *T. melanosporum*, es la que la selección de procedencias o progenies necesariamente lleva acarreada una pérdida de diversidad genética. Sin embargo, esto no tiene porqué implicar un aumento en los problemas fitosanitarios de la plantación, si el material tiene una adaptación adecuada a las condiciones de cultivo. En la actualidad, las plantaciones de *Q. ilex* subsp. *ballota* micorrizadas con *T. melanosporum* presentan putativamente una gran diversidad, ya se utiliza material no mejorado. Es por ello, que algunas de las plagas o enfermedades que aparecen en las plantaciones tienen un origen en el manejo (Pérez y Martín, 2018), puesto que en los ejemplares silvestres de *Q. ilex* subsp. *ballota* colindantes no se encuentran estos problemas.

El inóculo empleado procedió de carpóforos de *T. melanosporum* con diferentes orígenes. En este experimento, este factor fue común para ambos ensayos. En tanto en cuanto exista una interacción genotipo del árbol huésped x origen de la trufa, nuestros resultados pueden albergar una fuente de variación no controlada. El origen de *T. melanosporum*, puede ser por lo tanto un factor a tener en cuenta en futuros ensayos.

5.4. IMPLICACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTA MICORRIZADA CON *T. melanosporum*

Este estudio abre una nueva vía para la mejora de la calidad de la planta de vivero de *Q. ilex* subsp. *ballota* micorrizada con *T. melanosporum*. Hasta ahora, los estudios relativos a mejorar el proceso de producción de este tipo de planta se enfocaban en las condiciones de producción y de manejo de la planta dentro del vivero (García-Barreda et al., 2017; Piñuela et al., 2020). El adecuado conocimiento y manejo de estas dos condiciones permite tener unos amplios márgenes de mejora. Es de hecho, actualmente, el factor diferenciador entre los viveros productores de este tipo de planta. Normalmente, la calidad del inóculo, de los sustratos y los cuidados culturales están muy ligados a los porcentajes de micorrización de *T. melanosporum* (observación personal).

Sin embargo, como se ha podido ver en el estudio, frente a condiciones idénticas de producción y manejo los resultados entre procedencias y familias han sido sustancialmente diferentes. Por ejemplo, a nivel de procedencias las diferencias a nivel de porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* pueden llegar a ser de casi el doble. Esta evidencia tiene una implicación a nivel práctico muy interesante, pudiéndose obtener mejoras en la calidad de la planta con una correcta elección del origen del material forestal de reproducción. Para ello, sin embargo, sería recomendable la utilización de procedencias que aseguren una buena adaptación de las plantas adultas, y la realización de ensayos por parte de los propios viveristas.

Algunos resultados interesantes con aplicaciones para la producción de planta en vivero, son las correlaciones fenotípicas observadas para procedencias y progenies. Las correlaciones nos indican la interdependencia entre dos caracteres fenotípicos a nivel de planta individual. Tanto en el ensayo de procedencias como en el de progenies, se han podido ver correlaciones significativas positivas muy altas entre el número total de ápices y el número total de micorrizas de *T. melanosporum* (0,59 y 0,82, respectivamente). Esto implica que el logro de un buen desarrollo radical, independientemente de la procedencia o progenie que se utilice, puede tener buenos resultados en términos de micorrización con este hongo. Para el caso de las progenies, además, se pudo ver que se dio una correlación significativa muy fuerte (0,79) entre estas dos variables a nivel genético. Lo cual, permitiría seleccionar, desde el punto de vista de la mejora genética, de forma indirecta a través de los caracteres las mejores progenies que darán la siguiente generación mejorada. En este caso, la selección a través del número de ápices totales, de forma más simple de biomasa radical, podría permitir seleccionar los mejores progenitores, si se quisiera emprender un programa de mejora.

La selección de procedencias o progenies con mejor aptitud para la micorrización, no implica sin embargo que vayan a ser siempre buenas productoras de trufa. La adaptación del material vegetal producido en vivero a la zona en la que se instala es un factor que hay que destacar por sus implicaciones prácticas. El uso de material forestal de reproducción, en este caso bellota, con una procedencia que tenga unas condiciones climáticas diferentes a la zona de plantación puede conllevar desajustes fenológicos, susceptibilidad a enfermedades y menor capacidad de supervivencia. Además, este es un fenómeno muy habitual para el tipo de planta que nos ocupa. Se debe a que la existencia de pocos viveros especializados en esta planta, situados en unas regiones muy concretas de la península y que suelen usar bellotas recolectadas en su entorno, hayan producido plantas que se han instalado en regiones climáticas en España muy diferentes.

Este estudio sienta las bases para comenzar la selección de progenitores de familias de *Q. ilex* subsp. *ballota*, que siendo ya buenos productores de carpóforos de *T. melanosporum*, también demuestren que su progenie es una buena productora de planta micorrizada.

6 **CONCLUSIONES**

- Se constataron diferencias significativas en el peso de la bellota entre las distintas procedencias.
- El peso de la bellota no tuvo una influencia significativa para la mayoría de los caracteres asociados a la micorrización de *Tuber melanosporum*.
- Sí que existió una influencia del bloque en los resultados. Esta heterogeneidad ambiental se manifestó en el ensayo de progenies, principalmente; y de forma particular influyó en el número total de ápices micorrizados de *T. melanosporum* y el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*.
- Se encontraron importantes diferencias significativas entre procedencias para el número total de ápices micorrizados de *T. melanosporum* y para el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*.
- Se encontraron diferencias significativas entre progenies para los principales caracteres morfológicos (altura y diámetro) y para el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*.
- Se encontraron correlaciones fenotípicas significativas en la mayoría de los caracteres analizados para los dos ensayos.
- Una importante excepción en las correlaciones fenotípicas fue la de los principales caracteres morfológicos de la planta (altura y diámetro) y el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*.
- Se pudo estimar la heredabilidad (h^2) del porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*, siendo ésta moderada 0,37 (0,27).
- Se pudo estimar la heredabilidad (h^2) para los diferentes parámetros ligados a la micorrización: Altura (0,71(0,37)), Diámetro (0,52(0,31)), Número de ápices totales (0,11(0,18)), Número de ápices micorrizados con *T. melanosporum* (0,15(0,18)).
- Los patrones de diferenciación cuantitativa entre procedencias (Q_{st}) parecen mostrar una selección divergente para diferentes caracteres implicados en la micorrización, u otros caracteres ligados a ellos.
- Estos resultados, confirmados en otros experimentos, abren la puerta a la posibilidad de la mejora de la planta a través de programas de mejora genética.

7 AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias al tutor y directores de este trabajo, por las recomendaciones y aportaciones. En especial, quería agradecer a Luis Santos del Blanco la oportunidad que me ha brindado dándome la posibilidad de realizarlo.

También, dar las gracias a todo el equipo de IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada, S.L., por las revisiones y aportaciones en el documento.

Por su puesto, agradecer el apoyo de mi familia y la gente más cercana durante todo el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- AEMET, 2020. Valores normales de datos climatológicos [WWW Document]. Agencia Estatal Meteorol. URL <http://www.aemet.es/es/portada>
- Alberto, F.J., Aitken, S.N., Alía, R., González-Martínez, S.C., Hänninen, H., Kremer, A., Lefèvre, F., Lenormand, T., Yeaman, S., Whetten, R., Savolainen, O., 2013. Potential for evolutionary responses to climate change - evidence from tree populations. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1645-1661. <https://doi.org/10.1111/gcb.12181>
- Alonso-Crespo, I.M., Silla, F., Jiménez del Nogal, P., Fernández, M.J., Martínez-Ruiz, C., Fernández-Santos, B., 2020. Effect of the mother tree age and acorn weight in the regenerative characteristics of *Quercus faginea*. *Eur. J. For. Res.* 139, 513-523. <https://doi.org/10.1007/s10342-020-01266-8>
- Andivia, E., Fernández, M., Vázquez-Piqué, J., Alejano, R., 2012. Two provenances of *Quercus ilex* ssp. *ballota* (Desf) Samp. nursery seedlings have different response to frost tolerance and autumn fertilization. *Eur. J. For. Res.* 131, 1091-1101. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0578-1>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., 2011. Package lme4: linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-42. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Becquer, A., Guerrero-Galán, C., Eibensteiner, J.L., Houdinet, G., Bücking, H., Zimmermann, S.D., Garcia, K., 2019. The ectomycorrhizal contribution to tree nutrition, en: *Advances in Botanical Research.* pp. 77-126. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.11.003>
- Bonito, G., Benucci, G.M.N., Hameed, K., Weighill, D., Jones, P., Chen, K.-H., Jacobson, D., Schadt, C., Vilgalys, R., 2019. Fungal-Bacterial Networks in the *Populus* Rhizobiome Are Impacted by Soil Properties and Host Genotype. *Front. Microbiol.* 10, 481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00481>
- Bruns, T.D., Szaro, T.M., Gardes, M., Cullings, K.W., Pan, J.J., Taylor, D.L., Horton, T.R., Kretzer, A., Garbelotto, M., Li, Y., 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol. Ecol.* 7, 257-272. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1998.00337.x>
- Caliskan, S., 2014. Germination and seedling growth of holm oak (*Quercus ilex* L.): effects of provenance, temperature, and radicle pruning. *iForest - Biogeosciences For.* 7, 103-109. <https://doi.org/10.3832/ifer0967-007>
- Casieri, L., Ait Lahmidi, N., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., Courty, P.E., Garcia, K., Charbonnier, M., Delteil, A., Brun, A., Zimmermann, S., Plassard, C., Wipf, D., 2013. Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* 23, 597-625. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9>
- Chevalier, G., Pargney, J.C., 2014. Empirical or rational truffle cultivation? It is time to choose. *For. Syst.* 23, 378-384. <https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04964>
- Cocina, L., Barriuso, J.J., Martín-Santafé, M., Sánchez, S., 2013. A review of nurseries producing mycorrhizal plants in Spain and the world. 1er Congr. Int. Truficultura. Tuber 2013, Teruel (Spain), March 5-8.
- Courty, P.E., Doidy, J., Garcia, K., Wipf, D., Zimmermann, S.D., 2016. The transportome of mycorrhizal systems, en: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis.* pp. 239-256. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch14>
- De Miguel, A.M., Águeda, B., Sánchez, S., Parladé, J., 2014. Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza* 24, 5-18. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0554-3>

- Downie, J., Silvertown, J., Cavers, S., Ennos, R., 2020. Heritable genetic variation but no local adaptation in a pine-ectomycorrhizal interaction. *Mycorrhiza* 30, 185-195. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00941-3>
- Falconer, D.S., 1989. Introduction to quantitative genetics. New York. Longman.
- García-Barreda, S., Camarero, J.J., Vicente-Serrano, S.M., Serrano-Notivol, R., 2020. Variability and trends of black truffle production in Spain (1970-2017): Linkages to climate, host growth, and human factors. *Agric. For. Meteorol.* 287, 107951. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.107951>
- García-Barreda, S., Molina-Grau, S., Reyna, S., 2017. Fertilisation of quercus seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*: Effects on growth and mycorrhization of two host species and two inoculation methods. *IForest* 10, 267-272. <https://doi.org/10.3832/ifor2096-009>
- García-Nogales, A., Linares, J.C., Laureano, R.G., Seco, J.I., Merino, J., 2016. Range-wide variation in life-history phenotypes: spatiotemporal plasticity across the latitudinal gradient of the evergreen oak *Quercus ilex*. *J. Biogeogr.* 43, 2366-2379. <https://doi.org/10.1111/jbi.12849>
- García, K., Doidy, J., Zimmermann, S.D., Wipf, D., Courty, P.E., 2016. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends Plant Sci.* 21, 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>
- Gehring, C.A., Sthultz, C.M., Flores-Rentería, L., Whipple, A. V., Whitham, T.G., 2017. Tree genetics defines fungal partner communities that may confer drought tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 11169-11174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704022114>
- Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chakraborty, S., Chaudhary, V.B., Gardes, M., Gehring, C.A., Hart, M.M., Housworth, E.A., Kaonongbua, W., Klironomos, J.N., others, 2018. Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Commun. Biol.* 1, 1-10.
- Hoeksema, J.D., Thompson, J.N., 2007. Geographic structure in a widespread plant-mycorrhizal interaction: pines and false truffles. *J. Evol. Biol.* 20, 1148-1163. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01287.x>
- Hong-Tai Fai, A., Cornelius, P.L., 1996. Approximate F-tests of multiple degree of freedom hypotheses in generalized least squares analyses of unbalanced split-plot experiments. *J. Stat. Comput. Simul.* 54, 363-378. <https://doi.org/10.1080/00949659608811740>
- Isik, F., McKeand, S.E., 2019. Fourth cycle breeding and testing strategy for *Pinus taeda* in the NC State University Cooperative Tree Improvement Program. *Tree Genet. Genomes* 15, 70. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1377-y>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R.H.B., 2017. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Softw.* 82. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lamit, L.J., Holeski, L.M., Flores-Rentería, L., Whitham, T.G., Gehring, C.A., 2016. Tree genotype influences ectomycorrhizal fungal community structure: Ecological and evolutionary implications. *Fungal Ecol.* 24, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.05.013>
- Lang, C., Finkeldey, R., Polle, A., 2013. Spatial Patterns of Ectomycorrhizal Assemblages in a Monospecific Forest in Relation to Host Tree Genotype. *Front. Plant Sci.* 4, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00103>
- Lehnert, H., Serfling, A., Enders, M., Friedt, W., Ordon, F., 2017. Genetics of mycorrhizal symbiosis in winter wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* 215, 779-791.

<https://doi.org/10.1111/nph.14595>

- Leski, T., Aučina, A., Skridaila, A., Pietras, M., Riepšas, E., Rudawska, M., 2010. Ectomycorrhizal community structure of different genotypes of Scots pine under forest nursery conditions. *Mycorrhiza* 20, 473-481. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0298-2>
- López, R., López de Heredia, U., Collada, C., Cano, F.J., Emerson, B.C., Cochard, H., Gil, L., 2013. Vulnerability to cavitation, hydraulic efficiency, growth and survival in an insular pine (*Pinus canariensis*). *Ann. Bot.* 111, 1167-1179. <https://doi.org/10.1093/aob/mct084>
- Lumaret, R., Mir, C., Michaud, H., Raynal, V., 2008. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Mol. Ecol.* 11, 2327-2336. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01611.x>
- MAPA, 2020. Catálogo Nacional de Materiales de Base, en: Catálogo Nacional de Materiales de Base para la producción de MFR Identificado.
- Mollá, S., Villar-Salvador, P., García-Fayos, P., Rubira, J.L.P., 2006. Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L. (holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. *For. Ecol. Manage.* 237, 218-226.
- Morcillo, M., Sánchez, M., Villanova, X., 2015. Cultivar trufas: una realidad en expansión, 1.ª ed. MICOFORA.
- Moreira, X., Zas, R., Solla, A., Sampedro, L., 2015. Differentiation of persistent anatomical defensive structures is costly and determined by nutrient availability and genetic growth-defence constraints. *Tree Physiol.* 35, 112-123. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu106>
- Ortego, J., Bonal, R., Muñoz, A., Aparicio, J.M., 2014. Extensive pollen immigration and no evidence of disrupted mating patterns or reproduction in a highly fragmented holm oak stand. *J. Plant Ecol.* 7, 384-395. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtt049>
- Palacios, G., Navarro Cerrillo, R.M., del Campo, A., Toral, M., 2009. Site preparation, stock quality and planting date effect on early establishment of Holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings. *Ecol. Eng.* 35, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.09.006>
- Palazon, C., Barriuso, J.J., 2012. Viveros y producción de planta micorrizada, en: Ed. Mundi-Prensa (Ed.), Truficultura. Fundamentos y técnicas. Madrid, España, pp. 209-236.
- Paolocci, F., 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber spp.* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 23-30. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00088-9)
- Pérez-Izquierdo, L., Zabal-Aguirre, M., Flores-Rentería, D., González-Martínez, S.C., Buée, M., Rincón, A., 2017. Functional outcomes of fungal community shifts driven by tree genotype and spatial-temporal factors in Mediterranean pine forests. *Environ. Microbiol.* 19, 1639-1652. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13690>
- Pérez, V., Martín, M., 2018. La sanidad en truficultura. Guía de identificación de agentes nocivos en truficultura., 1.ª ed. Teruel, España.
- Petit, R.J., Hampe, A., 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37, 187-214. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110215>
- Piculell, B.J., José Martínez-García, P., Nelson, C.D., Hoeksema, J.D., 2019. Association mapping of ectomycorrhizal traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Mol. Ecol.* 28, 2088-2099. <https://doi.org/10.1111/mec.15013>

- Piñuela, Y., Alday, J.G., Oliach, D., Bolaño, F., Colinas, C., Bonet, J.A., 2020. Use of inoculator bacteria to promote *Tuber melanosporum* root colonization and growth on *Quercus faginea* saplings. *Forests* 11. <https://doi.org/10.3390/F11080792>
- Raamírez-Valiente, J.A., Lorenzo, Z., Soto, A., Valladares, F., Gil, L., Aranda, I., 2009. Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Mol. Ecol.* 18, 3803-3815. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04317.x>
- Ramírez-Valiente, J.A., Valladares, F., Sánchez-Gómez, D., Delgado, A., Aranda, I., 2014. Population variation and natural selection on leaf traits in cork oak throughout its distribution range. *Acta Oecologica* 58, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2014.04.004>
- Reino de España, 2003. Real Decreto 289/2003 de 7 de marzo sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. *Boletín Of. del Estado* 58, 9262-9299.
- Reyna, S., 2012. *Truficultura. Fundamentos y técnicas.*, 2012.^a ed. Madrid.
- Reyna, S., Garcia-Barreda, S., 2014. Black truffle cultivation: a global reality. *For. Syst.* 23, 317. <https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04771>
- Robledo-Arnuncio, J.J., Gil, L., 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity (Edinb.)* 94, 13-22. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800542>
- Rosado, S.C.S., Kropp, B.R., Piché, Y., 1994. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 126, 111-117. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb07544.x>
- Rúa, M.A., Antoninka, A., Antunes, P.M., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Lamit, L.J., Piculell, B.J., Bever, J.D., Zabinski, C., Meadow, J.F., others, 2016. Home-field advantage? Evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evol. Biol.* 16, 122.
- Rúa, M.A., Lamit, L.J., Gehring, C., Antunes, P.M., Hoeksema, J.D., Zabinski, C., Karst, J., Burns, C., Woods, M.J., 2018. Accounting for local adaptation in ectomycorrhizas: a call to track geographical origin of plants, fungi, and soils in experiments. *Mycorrhiza* 28, 187-195. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0811-y>
- Sánchez-Vilas, J., Retuerto, R., 2007. *Quercus ilex* shows significant among-population variability in functional and growth traits but maintains invariant scaling relations in biomass allocation. *Int. J. Plant Sci.* 168, 973-983. <https://doi.org/10.1086/518943>
- Santini, F., Ferrio, J.P., Hereş, A.-M., Notivol, E., Piqué, M., Serrano, L., Shestakova, T.A., Sin, E., Vericat, P., Voltas, J., 2018. Scarce population genetic differentiation but substantial spatiotemporal phenotypic variation of water-use efficiency in *Pinus sylvestris* at its western distribution range. *Eur. J. For. Res.* 137, 863-878. <https://doi.org/10.1007/s10342-018-1145-9>
- Santos-del-Blanco, L., Climent, J., González-Martínez, S.C., Pannell, J.R., 2012. Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Ann. Bot.* 110, 1449-1460. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs210>
- Santos-del-Blanco, L., Notivol, E., Zas, R., Chambel, M.R., Majada, J., Climent, J., 2010. Variation of early reproductive allocation in multi-site genetic trials of Maritime pine and Aleppo pine. *For. Syst.* 19, 381-392.
- Smith, S., Read, D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3.^a ed, The Netherlands: Academic Press. Elsevier, New York. <https://doi.org/10.1097/00010694-198403000-00011>
- Team, R.C.D., 2012. *R: A language and environment for statistical computing.* R Found. Stat. Comput. Vienna Austria.

Alumno: Iván Franco Manchón

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Titulación: Máster en Ingeniería de Montes

- Tedersoo, L., Baharam, M., Toots, M., Diédhiou, A.G., Henkel, T.W., Kjoller, R., Morris, M.H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K.G., Pölme, S., Ryberg, M., Smith, M.E., Kõljag, U., 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Mol. Ecol.* 21, 4160-4170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05602.x>
- Uscola, M., Villar-Salvador, P., Gross, P., Maillard, P., 2015. Fast growth involves high dependence on stored resources in seedlings of Mediterranean evergreen trees. *Ann. Bot.* 115, 1001-1013.
- Valero Galván, J., Jorrín Novo, J.J., Cabrera, A.G., Ariza, D., García-Olmo, J., Cerrillo, R.M.N., 2012. Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). *Eur. J. For. Res.* 131, 893-904. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0563-8>
- Velmala, S.M., Rajala, T., Haapanen, M., Taylor, A.F.S., Pennanen, T., 2013. Genetic host-tree effects on the ectomycorrhizal community and root characteristics of Norway spruce. *Mycorrhiza* 23, 21-33. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0446-y>
- Villar-Salvador, P., Heredia, N., Millard, P., 2010. Remobilization of acorn nitrogen for seedling growth in holm oak (*Quercus ilex*), cultivated with contrasting nutrient availability. *Tree Physiol.* 30, 257-263.
- Villar-Salvador, P., Nicolás, J.L., Heredia, N., Uscola, M., 2013. *Quercus ilex* L. Prod. y manejo semillas y plantas *For.* 2, 226-249.
- Villar-Salvador, P., Planelles, R., Enríquez, E., Rubira, J.P., 2004. Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *For. Ecol. Manage.* 196, 257-266.
- Villar-Salvador, P., Puértolas, J., Cuesta, B., Peñuelas, J.L., Uscola, M., Heredia-Guerrero, N., Benayas, J.M.R., 2012. Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. *New For.* 43, 755-770.
- White, G.M., Boshier, D.H., Powell, W., 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2038-2042. <https://doi.org/10.1073/pnas.042649999>

ANEXO I: SCRIPT

```
library(lmerTest)
library(lme4)
library(boot)
rm(list=ls(all=TRUE))

#load data
gen<-read.table("dataset_h2_micorrizacion.csv", header=T, sep=";")
gen$blo<-as.factor(gen$blo)
gen$ID<-as.factor(gen$ID)
gen$fam<-as.factor(gen$fam)
str(gen) # Ok

# 1 Test de la influencia de la procedencia
  # Peso bellota
mod1<-lmer(pesobellota~proc+(1|fam), data=gen)
anova(mod1)
  # h
mod1<-lmer(h~proc+pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
anova(mod1)
  # d
mod1<-lmer(d~proc+pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
anova(mod1)
  # ápices totales
mod1<-lmer(apices~proc+pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
anova(mod1)
  # n micorrizas
mod1<-lmer(micorrizas~proc+pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
anova(mod1)
  # micorrización
mod1<-lmer(micorrizacion~proc+pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
```

```
anova(mod1)

# modelos de máxima verosimilitud
# h
mod_h<-lmer(h~pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
rand(mod_h)
summary(mod_h)
# d
mod_d<-lmer(d~pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
rand(mod_d)
summary(mod_d)
# ápices totales
mod_apices<-lmer(apices~pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
rand(mod_apices)
summary(mod_apices)
# n micorrizas
mod_micorrizas<-lmer(micorrizas~pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
rand(mod_micorrizas)
summary(mod_micorrizas)
# micorrización
mod_micorrizacion<-lmer(micorrizacion~pesobellota+(1|blo)+(1|fam), data=gen)
rand(mod_micorrizacion)
summary(mod_micorrizacion)

# Estimación por máxima verosimilitud con bootstrapping
h2 <- function (mer.obj) {          # funcion de calculo de heredabilidad
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(4*vars [1, 4]) / sum(vars[c(1,3),4])
}

h2(mod_h)
```

```
h2(mod_d)
h2(mod_apices)
h2(mod_micorrizas)
h2(mod_micorrizacion)

h2.boot_h <- bootMer (mod_h, h2, nsim= 1000) # Bootstrap
h2.boot_d <- bootMer (mod_d, h2, nsim= 1000)
h2.boot_apices <- bootMer (mod_apices, h2, nsim= 1000)
h2.boot_micorrizas <- bootMer (mod_micorrizas, h2, nsim= 1000)
h2.boot_micorrizacion <- bootMer (mod_micorrizacion, h2, nsim= 1000)

h2.boot_h
h2.boot_d
h2.boot_apices
h2.boot_micorrizas
h2.boot_micorrizacion

# Estimación por máxima verosimilitud con bootstrapping
cva <- function (mer.obj,x) {
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / x
}
cva_h <- function (mer.obj) {
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / mean(gen[,6])
}
cva_d <- function (mer.obj) {
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / mean(gen[,7])
}
cva_apices <- function (mer.obj) {
```

```
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / mean(gen[,12])
}
cva_micorrizas <- function (mer.obj) {
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / mean(gen[,14])
}
cva_micorrizacion <- function (mer.obj) {
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
(sqrt(4*vars [1, 4])) / mean(gen[,13])
}

cva(mod_h, mean(gen[,6]))
cva(mod_d,mean(gen[,7]))
cva(mod_apices,mean(gen[,12]))
cva(mod_micorrizas,mean(gen[,14]))
cva(mod_micorrizacion,mean(gen[,13]))

cva.boot_h <- bootMer (mod_h, cva_h, nsim= 1000) # Bootstrap
cva.boot_d <- bootMer (mod_d, cva_d, nsim= 1000)
cva.boot_apices <- bootMer (mod_apices, cva_apices, nsim= 1000)
cva.boot_micorrizas <- bootMer (mod_micorrizas, cva_micorrizas, nsim= 1000)
cva.boot_micorrizacion <- bootMer (mod_micorrizacion, cva_micorrizacion, nsim=
1000)

cva.boot_h
cva.boot_d
cva.boot_apices
cva.boot_micorrizas
cva.boot_micorrizacion
```

```
#### ensayo de procedencias
```

```
#load data
```

```
gen2<-read.table("dataset_procedencias.csv", header=T, sep=";")
```

```
gen2$blo<-as.factor(gen2$blo)
```

```
gen2$ID<-as.factor(gen2$ID)
```

```
gen2$planta<-as.factor(gen2$planta)
```

```
gen2$cont2<-log(1+gen2$cont)
```

```
str(gen2)
```

```
gen0 <- read.table(file = "clipboard", sep = "\t", header=TRUE)
```

```
mod0<-lm(pesobellota~proc, data=gen0)
```

```
HSD.test(mod0,"proc", group=TRUE)
```

```
# Existen diferencias entre procedencias para el peso de las bellotas
```

```
mod_p_d<-lmer(d~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
mod_p_ap<-lmer(apices~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
mod_p_mic<-lmer(micorrizas~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
mod_p_micz<-lmer(micorrizacion~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
mod_p_micz<-lmer(micorrizacion~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
mod_p_cont<-lmer(cont2~pesobellota+(1|blo)+(1|proc), data=gen2)
```

```
#Cálculo de Qst a partir de modelos y estimaciones de h2 previas
```

```
Qst_d <- function (mer.obj,x) {
```

```
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))
```

```
(vars [2, 4])/((2*0.5166*(vars[3,4])+(vars[2,4])))
```

```
}
```

```
Qst_ap <- function (mer.obj,x) {  
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))  
(vars [2, 4])/((2*0.1060694*(vars[3,4])+(vars[2,4])))  
}
```

```
Qst_mic <- function (mer.obj,x) {  
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))  
(vars [2, 4])/((2*0.1490948*(vars[3,4])+(vars[2,4])))  
}
```

```
Qst_micz <- function (mer.obj,x) {  
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))  
(vars [2, 4])/((2*0.368643*(vars[3,4])+(vars[2,4])))  
}
```

```
Qst_cont <- function (mer.obj,x) {  
vars <- as.data.frame (VarCorr (mer.obj))  
(vars [2, 4])/((2*0.368643*(vars[3,4])+(vars[2,4])))  
}
```

```
qst.boot_d <- bootMer (mod_p_d, Qst_d, nsim= 1000)  
qst.boot_ap <- bootMer (mod_p_ap, Qst_ap, nsim= 1000)  
qst.boot_mic <- bootMer (mod_p_mic, Qst_mic, nsim= 1000)  
qst.boot_micz <- bootMer (mod_p_micz, Qst_micz, nsim= 1000)  
qst.boot_cont <- bootMer (mod_p_cont, Qst_cont, nsim= 1000)
```

```
qst.boot_d
```

```
qst.boot_ap
```

```
qst.boot_mic
```

```
qst.boot_micz
```

```
qst.boot_cont
```