



Universidad de Valladolid

Máster

Gestión Forestal basada en Ciencia de Datos
(DATAFOREST)

Caracterización de las relaciones de
microorganismos del suelo en
plantaciones truferas mediante técnicas
machine learning

Alumno: Sergio Armenteros Quirce
Tutora académica: María Elena Hidalgo
Directores: Jaime Olaizola y Celia Herrero

15 de Julio de 2019



INDICE /INDEX

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1.- INTRODUCCIÓN.....	7
2.-OBJETIVO	8
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1. Lugar de estudio y toma de datos.	9
3.2. Análisis descriptivo.....	9
3.3. Análisis estadístico.....	10
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Resultados de riqueza y abundancia de hongos y bacterias.....	11
4.1.1 Comunidad bacteriana	12
4.1.2 Comunidad de hongos	13
4.2. Resultados de las relaciones entre especies.....	16
4.2.1 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de <i>Simple matching</i>	16
4.2.2 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de Jaccard.....	18
4.2.3 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de Russell & Rao	20
5. – CONCLUSIONES.....	24
6.- AGRADECIMIENTOS.....	25
8-. REFERENCIAS	26

RESUMEN

La trufa negra, *Tuber melanosporum* Vittad., es uno de los hongos micorrícicos más importantes desde el punto de vista socioeconómico. Recientemente han aumentado las plantaciones destinadas al cultivo de dicha especie y, aunque los factores abióticos que potencian la producción son bien conocidos, los factores bióticos como las interacciones que realiza *T. melanosporum* con otros organismos del suelo y que puedan potenciar su producción, han sido poco estudiados. El objetivo de este estudio fue caracterizar la biodiversidad microbiana de plantaciones de *T. melanosporum*, analizando también las relaciones que se producen entre las distintas especies de microorganismos del suelo con la trufa. Para ello, se realizó un análisis metagenómico en 10 lugares de muestreo para identificar las especies presentes en los suelos. El análisis de los datos consistió en un estudio descriptivo de riqueza y abundancia de las especies identificadas y un análisis clúster para encontrar la relación entre microorganismos del suelo y *T. melanosporum* en las plantaciones. El análisis clúster se llevó a cabo utilizando el método jerárquico aglomerativo *UPGMA* y de *Ward* mediante los algoritmos de *Simple Matching*, de Jaccard y de Russell & Rao.

Los resultados mostraron que los lugares de muestreo presentaron una gran diversidad de taxones de Alphaproteobacteria, Ascomycota y evidencias de grupos robustos de especies que siempre acompañan a *T. melanosporum*, así como algunas especies de interés por tener antecedentes como bacterias que favorecen la micorrización.

Los resultados de este trabajo son claves para encontrar relaciones entre microorganismos del suelo que permitan entender mejor la ecología de *T. melanosporum* y en último término iniciar el camino de nuevas técnicas para el aumento de producciones.

Palabras clave: comunidades microbianas, *Tuber melanosporum*, biodiversidad, machine learning, metagenómica.

ABSTRACT

The black truffle, *Tuber melanosporum* Vittad., is one of the most important mycorrhizal fungi in socio-economic terms today and the number of plantations destined to the cultivation of this species has recently increased. Although the abiotic factors that promote production are well known, biotic factors such as the interactions between *T. melanosporum* and other soil organisms that may promote its production have been poorly studied. The aim of this study was to characterize the microbial biodiversity of *T. melanosporum* plantations, analyzing the relationships that occur between different species of microorganisms. A metagenomic analysis was carried out in 10 *T. melanosporum* productive sites to identify the species present in those soils. To analyze the relationships between this fungus and soil organisms, a descriptive study of the richness and abundance of the identified species was carried out. In addition, a cluster analysis using the hierarchical agglomerative UPGMA and Ward methods of a co-occurrence matrix calculated from species using Simple Matching, Jaccard and Russell & Rao algorithms was. A great diversity of taxa of Alphaproteobacteria, Ascomycota and evidences of robust groups of species that always accompany *T. melanosporum* were found, as well as some species of interest for having antecedents as mycorrhiza helper bacteria.

The results of this study are essential to find relationships between soil microorganisms that allow a better understanding of the ecology of *T. melanosporum* and, eventually, to initiate new techniques to increase production.

Key words: microbial communities, *Tuber melanosporum*, biodiversity, machine learning, metagenomics.

1.- INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, los organismos no se presentan de forma aislada, sino que, en muchos casos, forman relaciones entre sí formando redes mutualistas, antagonistas o competitivas (Montoya, Pimm & Solé, 2006). Una relación mutualista es aquella en la cual los dos organismos implicados se benefician de esa relación. Un ejemplo de relación mutualista es la que llevan a cabo especies bacterias en prótesis médicas, formando todas ellas en conjunto una biopelícula para conceder resistencia antibiótica a los integrantes de dicha relación, suponiendo una amenaza a la salud (Rodríguez-Martínez, 2006). Por otra parte, una relación antagonista (depredación o parasitismo) es aquella en la que un organismo sale beneficiado y otro perjudicado. Un ejemplo de este tipo de relación es el que se da entre las bacterias y bacteriófagos, virus que hospedan bacterias y que utilizan su maquinaria genética para poder reproducirse y propagarse, en la mayoría de los casos, matando al huésped (Bohannan & Lenski, 2000). Dentro de estas relaciones podemos diferenciar cómo en el *amensalismo*, uno de los integrantes de la relación es dañado, pero el otro integrante no recibe ninguna ventaja. Esto ocurre, por ejemplo, cuando metabolitos secundarios de especies de *Lactobacilos* disminuyen el pH del medio en el que se encuentran, limitando el crecimiento de otros microorganismos (Hammes, 1995). Por otra parte, en el *comensalismo*, uno de los dos integrantes de la relación se beneficia sin causar perjuicio al otro. Esto ocurre, por ejemplo, en la biodegradación de la celulosa en el rumen de los mamíferos (Leschine, 2009), en la cual, ciertos microorganismos se nutren de componentes producidos por otros miembros de la comunidad microbiana que descomponen la celulosa. Por último, una relación competitiva es aquella en la que los dos organismos se perjudican mutuamente, como la que ocurre en los experimentos de co-cultivos de dos especies de ciliados (Gause, 1934), en la que el crecimiento de una de las especies limita el de la otra debido a la lucha por los recursos disponibles en el medio.

La presencia de determinadas especies y las interacciones-relaciones que se establecen entre ellas puede causar un impacto positivo (beneficio), negativo (perjuicio) o neutro sobre las especies involucradas o no en dicha relación. De esta manera, el conocimiento de estas interacciones (Lidicker, 1979) nos permite comprender la estructura, complejidad y estabilidad de muchas comunidades biológicas (May, 2001; Pimm, 1982). Una de las comunidades biológicas más diversas son los hongos, microorganismos eucariotas que desempeñan funciones ecológicas fundamentales como saprófitos, simbioses o patógenos de plantas y animales. Los hongos realizan distintas funciones en el ecosistema como impulsar el ciclo del carbono en los suelos forestales [aliviando las limitaciones de carbono de otros organismos del suelo (Wardle & Lindahl, 2014), mediar en la nutrición mineral de las plantas y permitir que las plantas presenten mayor resistencia en su desarrollo por las relaciones simbióticas (micorrícicas) que se producen con ellas (Caldwell, 2017; Tedersoo, May & Smith, 2010). Los hongos representan uno de los grupos de organismos más diversos, con al menos 100.000 especies descritas (Blackwell, 2011). Sin embargo, también es uno de los grupos de organismos más desconocidos, estimándose que su diversidad puede estar entre 0,8 y 5,1 millones de especies (Blackwell, 2011; Mueller & Schmit, 2007).

Tuber melanosporum Vittad. es un hongo Ascomycota que forma ectomicorrizas en asociaciones simbióticas con raíces de especies forestales arbóreas (Mello, Murat & Bonfante, 2006b) de los géneros *Quercus* y *Corylus*, principalmente. Como especie micorrícica, la trufa mejora la salud y nutrición de las plantas simbioses (Martin et al.,

2001; Buscot et al., 2000; Read, 1991), así como su crecimiento radicular y capacidad fotosintética (Nardinia, Salleo, Tyree & Vertovec, 2000). La trufa negra es un hongo hipogeo, que crece preferiblemente en suelos calcáreos (Linde & Selmes, 2012) y que se distribuye fundamentalmente por Francia, Italia y la Península Ibérica (Ceruti et al., 2003), aunque debido a su creciente importancia a nivel socioeconómico, la superficie destinada a truferas ha aumentado en las últimas décadas (Hall, Brown, & Zambonelli 2008; Mello, Murat & Bonfante, 2006a), habiéndose introducido en otros países de forma satisfactoria, como Nueva Zelanda, Australia y EEUU (Bonet et al., 2009). El gran valor económico de este hongo ha incentivado su cultivo mediante las inoculaciones controladas desde hace ya dos siglos (Mello et al., 2006b). Así como se ha avanzado mucho en el conocimiento técnico sobre las prescripciones selvícolas para el buen desarrollo de una plantación (Olivier et al., 2002), la investigación sobre la influencia de distintos factores bióticos, como la comunidad microbiana asociada y las interacciones que se dan entre las especies y con *T. melanosporum*, es limitada.

En la última década algunos estudios han descrito las comunidades microbianas que acompañan especies del género *Tuber*, lo que incluye bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Pacioni et al., 2007; Barbieri et al., 2005, 2007; Buzzini et al., 2005;). La mayoría de estos estudios se han centrado en el estudio de los organismos presentes en el peridio, glebas y ascocarpos de esas especies. Así, las bacterias han sido las más estudiadas en algunos casos, llegando a caracterizarse ciertas comunidades en las especies *Tuber aestivum* Vittad. (Gryndler & Hršelová, 2013), *T. magnatum* (Barbieri et al., 2007), *T. borchii* (Barbieri et al., 2005; Sbrana et al., 2002) y *T. melanosporum* (Rivera, Blanco, Oria & Venturini, 2010). En Anthony-Babu et al. (2014) describieron que la comunidad de bacterias acompañante depende de la fase del ciclo de vida, pero, sobre todo, de la etapa de la formación de la trufa. Además, se ha sugerido en ciertos estudios que las comunidades bacterianas están implicadas en las fases de crecimiento y nutrición durante el desarrollo de los ascocarpos en *T. borchii* y (Barbieri et al., 2010, 2007; Sbrana et al., 2002, 2000). Estudios previos han mostrado que aunque la comunidad microbiana acompañante está muy relacionada con la especie de *Tuber* que se esté estudiando, hay un núcleo estable de Alphaproteobacteria acompañando a los diferentes integrantes de interés del género *Tuber* (Splivallo et al., 2019; Antony-Babu et al., 2014; Barbieri et al., 2007, 2005;). Sin embargo, la información existente sobre comunidades microbianas existentes en el suelo que interactúan con *Tuber melanosporum* es muy escasa, siendo necesaria conocer las relaciones que se dan entre las distintas especies de hongos, las redes ecológicas que forman y las dinámicas que las perfilan y que desarrollan con especies de otros reinos, como por ejemplo, con las bacterias, pues es una información fundamental desde el punto de vista ecológico y para la gestión forestal sostenible de las plantaciones truferas.

2.-OBJETIVO

El objetivo de este estudio es caracterizar la biodiversidad microbiana de plantaciones de *Tuber melanosporum*, analizando las relaciones que se producen entre las distintas especies de microorganismos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio y toma de datos.

Los datos proceden de muestras de suelo recogidas en 10 plantaciones truferas ubicadas en el norte de España. Las muestras recogidas fueron secadas hasta peso constante, tamizadas (malla de 1 mm) y homogeneizadas para su posterior análisis. De cada una de las muestras se tomaron 0,25 gramos para el aislamiento del ADN y la cantidad restante de muestra se dividió en dos sub-muestras que se mantuvieron congeladas (-20°C) en tubos herméticos en dos congeladores independientes. Para el aislamiento del ADN del suelo, se utilizó el kit Quiagen DNeasyPowerSoil Kit (Nº de catálogo / ID: 12888-100), utilizando 100 microlitros de la solución C6 suministrada (10mM Tris) para la elución. Las muestras se almacenaron debidamente etiquetadas y congeladas (a -20°C) hasta su utilización.

Todas las reacciones de PCR se prepararon utilizando equipos esterilizados por UV y se realizaron controles negativos junto con las muestras. Se obtuvieron muestras de tBiome-Makers amplificando la región de 16s rRNA V4 mientras que las ITS se obtuvieron amplificando la región de ITS1 utilizando cebadores personalizados WineSeq® (Patente WO2017096385). Las muestras se agruparon en cantidad equimolar antes de la secuenciación. Todas las secuencias se prepararon siguiendo el protocolo PCR Illumina de dos pasos y posteriormente se secuenciaron en el instrumento Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) usando lecturas de 2x301 *paired-end* para muestras de Biome-Makers.

Todos los datos fueron analizados a través de un proceso bioinformático personalizado basado en QIIME (Patente WO2017096385, BiomeMakers). Un primer control de calidad fue empleado para quitar adaptadores y quimeras. Después de eso, las secuencias brutas (*reads*) fueron recortadas y los grupos de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) fueron asignados con una identidad mínima del 97%. La asignación taxonómica y la estimación de abundancia se obtuvieron comparando los grupos de OTU obtenidos con la base de datos de taxonomía WineSeq® (Patente WO2017096385).

Los datos obtenidos se recopilaron para construir una matriz única con 1853 OTUs (especies), procedentes de los 10 lugares de muestreo. Se determinó la representatividad (%) de cada especie en cada lugar de muestreo. Las OTUs que no pudieron ser identificados a nivel de especie fueron descartadas para los análisis estadísticos para evitar sesgos y errores.

3.2. Análisis descriptivo

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de la riqueza y abundancia de las especies presentes de los reinos Fungi y Bacteria. La riqueza total se determinó como el número de OTUs por reino, filo, clase, género y lugar de muestreo. Por otro lado, la abundancia se expresó como la frecuencia de aparición de la especie *i* en el lugar de muestreo *j* y se calculó por reino, filo, clase y género. En el caso de los hongos, para cada taxón, se clasificaron en función de su grupo funcional (simbionte, saprófito y patógeno) mediante la herramienta FUNGuild (Nguyen et al., 2016) determinándose también la riqueza y abundancia por grupo funcional y por lugar de muestreo.

3.3. Análisis estadístico

Se llevó a cabo la construcción de un dendrograma para analizar las relaciones entre organismos. Un dendrograma es una técnica de aprendizaje automático no supervisado para analizar los datos. Para ello, se construyó la matriz A_{ij} donde la cantidad de especies i en el lugar de muestreo j fue determinada utilizando tres algoritmos diferentes para el cálculo los coeficientes de similitud entre especies. Los algoritmos fueron la correlación simple o *simple matching* (Sola & Michener, 1958), el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1901) y el coeficiente de Russell and Rao (Russell & Rao, 1940), muy utilizados en biología para estudios de asociaciones de especies (Legendre & Legendre, 1984; Harvey, 1981, 1978; Peters, 1971). Los tres son coeficientes métricos de co-ocurrencia (Clifford & Stephenson, 1975).

Tabla 1 - Diferentes algoritmos de disimilitud usados en el estudio.

Coeficiente	Algoritmo	Fuente
Jaccard	$\frac{a}{a + b + c}$	Jaccard (1901)
Russell & Rao	$\frac{a}{a + b + c + d}$	Russell & Rao (1940)
Simple Matching	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	Sola & Michener (1958)

Nota: donde a, b, c y d se derivan de una tabla de contingencia, siendo "a" la co-presencia de la especie x e y , "b" presencia de x y ausencia de y , "c" ausencia de x y presencia de y , y d ausencia de ambas especies. $a + b + c + d$ representa el número total de lugares (N).

Se utilizó el IDE de Python Spyder (<https://www.spyder-ide.org/>) para el cálculo de las similitudes de las diferentes especies (Python Software Foundation). Se usaron los paquetes Numpy, Fastclutster, Intertools y Panda, incluidos en el entorno SciPy (<https://www.scipy.org>). Los criterios utilizados para la construcción del dendrograma fueron el de mínima Varianza de *Ward* (Ward, 1963), que minimiza la varianza dentro de cada agrupamiento y el *Unweighted pair group method method of averaging (UPGMA)* (Sneath & Sokal, 1973) que define la distancia entre dos clústeres como la media aritmética de todas las distancias dos a dos entre los miembros de los clústeres. El nivel de disimilitud al que se corta el dendrograma para obtener los clústeres se eligió siguiendo una regla variable (Herrera, 2000) ya que cada método proporcionaba distancias bastante diferentes entre sí. Los dendrogramas obtenidos por el algoritmo *Simple matching* mediante *Ward* y *UPGMA*, el algoritmo de Jaccard y método *Ward*, y el obtenido mediante el algoritmo de Russell & Rao con el método *UPGMA* se cortaron a un nivel de disimilitud de 0,2. El dendrograma obtenido mediante el algoritmo de Jaccard y el método *UPGMA* se cortó a un nivel de disimilitud de 0,4. Por último, el dendrograma obtenido por el algoritmo de Russell & Rao y el método *Ward* se cortó a un nivel de disimilitud de 0,1.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de riqueza y abundancia de hongos y bacterias.

En la comunidad microbiana estudiada, donde se analizaron hongos y bacterias, se identificaron un total de 15 filos, 315 géneros y 512 especies (100 taxones correspondientes a bacterias y 412 a hongos). Los resultados mostraron que la comunidad microbiana (Figura 1), estuvo en su mayor parte por los filos Ascomycota (con un 50% de la riqueza de filos), seguido de Basidiomycota (26%), Actinobacteria (7%), Proteobacteria (7%), Firmicutes (3%) y Mucoromycota (3%). El resto de filos tuvieron una representación menor (4%).

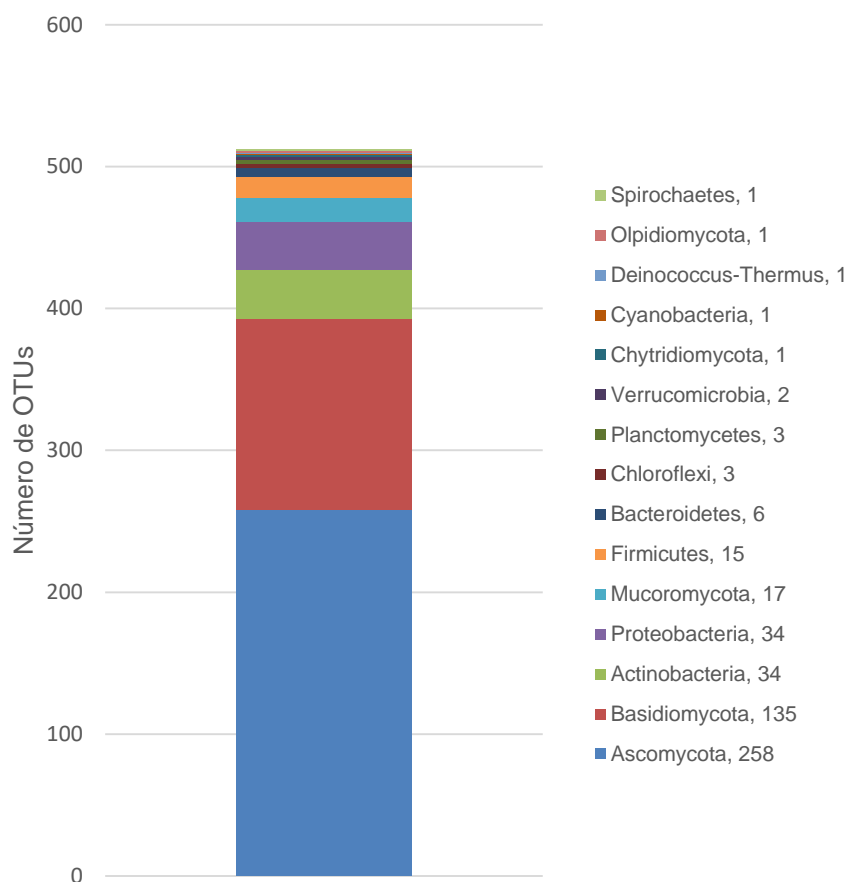


Figura 1 - Riqueza total de filos de hongos y bacterias.

Nota: el número que acompaña a los filos es el número de OTUs que se incluyen en dicho filo.

4.1.1 Comunidad bacteriana

En cuanto a la comunidad bacteriana de estos lugares, los filos más abundantes fueron Actinobacteria, con un 34% de la riqueza de especies, al igual que Proteobacteria (34%), seguido de Firmicutes (15%) y Bacteroidetes (6%). El resto de filos supusieron un 11% de la riqueza (Figura 2). Además, los resultados mostraron que se identificaron un total de 79 géneros diferentes.

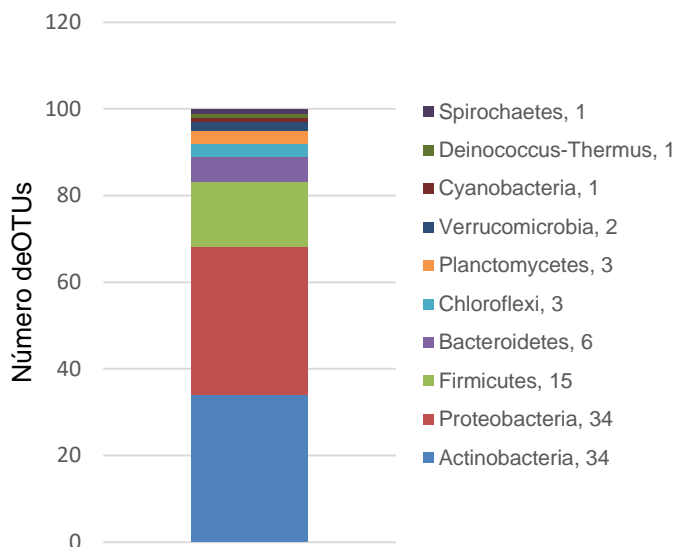


Figura 2 - Riqueza taxonómica de los filos de Bacteria.

Nota: el número que acompaña a los filos es el número de OTUs que se incluyen en dicho filo.

Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos, como el llevado a cabo por Mediavilla et al. (2019), donde se estudiaron las comunidades bacterianas de suelos productivos de *Boletus edulis* en los que se han aplicado diferentes tratamientos de prevención de incendios. Estos autores encontraron que los filos de bacterias más diversos fueron Proteobacteria (25% de riqueza de la comunidad bacteriana) y Actinobacteria (14%). Otro estudio (Zhang et al., 2019) donde se analizaron las comunidades microbianas de *Tuber indicum*, la trufa negra china, en suelos de *Quercus acutissima*, encontraron que los filos más representados fueron Proteobacteria (52% de la riqueza) y Actinobacteria (24%). Sin embargo, representantes de éste último filo no fueron encontrados en nuestros lugares de muestreo.

Los resultados mostraron, además, que dentro de las Proteobacterias (Figura 3), el 59% de los OTUs pertenecían a las Alphaproteobacteria, seguido de la clase Gammaproteobacteria (18%), Deltaproteobacteria (12%), Betaproteobacteria (9%) y Oligoflexia (3%).

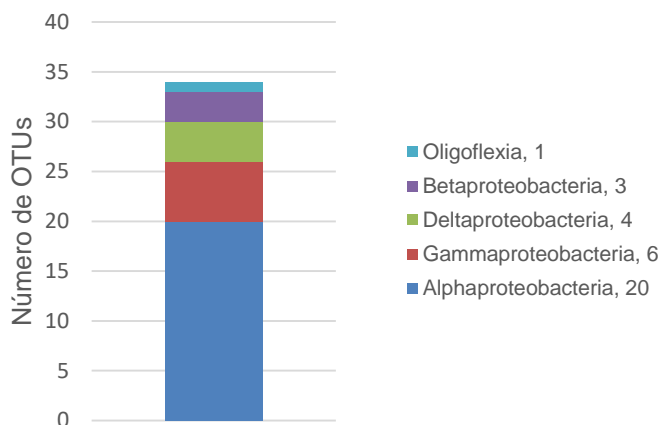


Figura 3 - Riqueza taxonómica de clases de Proteobacterias.

Nota: el número que acompaña a los filos es el número de OTUs que se incluyen en dicho filo.

Varios estudios detectaron una alta diversidad de Alphaproteobacteria en *Tuber panzhihuanense* y otras trufas cultivadas en China (Fu et al., 2016; Yang et al., 2019), incluso en el caso de *Boletus edulis* (Mediavilla et al., 2019). Resultados similares sobre la riqueza de Proteobacteria se han encontrado en la etapa de maduración de *Tuber melanosporum* (Antony-Babu et al., 2014). Las Alphaproteobacteria son capaces de adaptarse a una gran cantidad de hábitats y ecosistemas (Ettema & Anderson, 2009). El filo Alphaproteobacteria es dominante no sólo en trufas (Antony-Babu et al., 2014; Barbieri et al., 2007, 2005) sino también en el hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* (Bertaux et al., 2005), sugiriendo la existencia de algún tipo de mecanismo adaptativo o competitivo sobre otros filos bacterianos. Se desconoce qué es lo que crea la ventaja competitiva de Alphaproteobacteria en las trufas, pero podría estar impulsada por una mayor capacidad para competir por recursos específicos o para degradar y/o producir metabolitos secundarios tóxicos (Hibbing et al., 2010). Estas similitudes entre los estudios y entre las especies de trufas sugieren que los cuerpos fructíferos de la trufa, independientemente de la especie, proporcionan un hábitat específico para algunas bacterias (Splivallo et al., 2019, 2015).

4.1.2 Comunidad de hongos

Cinco filos aparecen representando a los hongos en los lugares de muestreo: Ascomycota (62% de la riqueza), Basidiomycota (32%), Mucoromycota (4%), Olpidiomycota (1%) y Chytridiomycota (1%) (Figura 4). Los más ricos en número de OTUs fueron Ascomycota y Basidiomycota. El filo Ascomycota fue el que tuvo una mayor riqueza de especies.

Este hallazgo concuerda con varios estudios de diversidad global de hongos, como el llevado a cabo por (Tedersoo et al., 2014), donde se estudió la diversidad de hongos presentes en el suelo de diferentes tipos de ecosistemas, hallando que el filo con más cantidad de OTUs diferentes fue Ascomycota (49% del total de OTUs). En ciertos estudios de biodiversidad fúngica en diferentes hábitats Ascomycota es el filo con mayor riqueza de OTUs (Geml, Gravendeel et al., 2014; Geml, Pastor et al., 2014), algo que concuerda con nuestros resultados (Figura 4). En el caso de *Tuber indicum* inoculado en *Quercus acutissima*, el filo más observado fue Ascomycota (Zhang et al., 2019). En

general, las comunidades de microorganismos en el suelo, ectomicorrizas y cuerpos fructíferos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos, han sido considerados en otros estudios estrechamente relacionadas con el desarrollo y la nutrición del ascocarpo de las trufas (Splivallo et al., 2015).

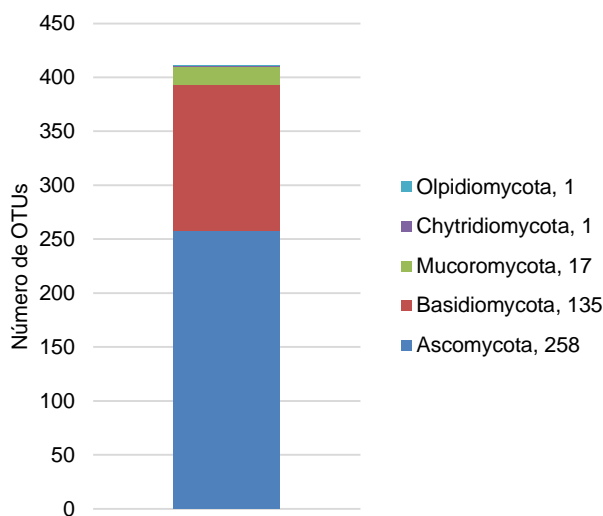


Figura 4 - Riqueza taxonómica de los fillos de hongos.

Nota: el número que acompaña a los fillos es el número de OTUs que se incluyen en dicho filo.

Los resultados mostraron que se identificaron un total de 236 géneros distintos de hongos. Los más ricos fueron *Penicillium* (con 20 especies), *Cryptococcus* (17 especies), *Aspergillus* (10 especies), *Mortierella* (10 especies) y *Coprinellus* (8 especies), entre otros. *Mortierella* apareció también como uno de los géneros más abundantes en Fu et al. (2016), no así como el resto de géneros, que parecen ser más variables dependiendo del lugar de muestreo y la especie de *Tuber*. Dentro de los grupos funcionales de los hongos (Figura 5), 233 especies se consideraron saprófitos (57%), 138 patógenos o parásitos (33%) y 41 simbioses (10%).

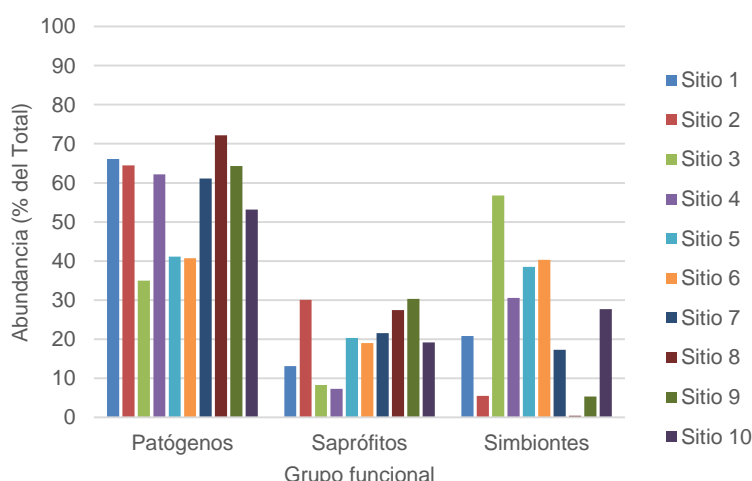


Figura 5 - Proporción de abundancias totales de cada grupo funcional para cada lugar. La abundancia se presenta como frecuencia de aparición sobre el total.

Los resultados mostraron que el único lugar donde no se encontró la especie *Tuber melanosporum* fue el 8, donde la abundancia de hongos simbióticos fue mínima y la abundancia de especies patógenos mayor. Por otra parte, los lugares de muestreo más productivos de *T. melanosporum* que fueron, el 3, 5, 6 y en último lugar el 4, salvo en este último, la abundancia relativa de patógenos también fue menor. Trabajos anteriores han sugerido que los hongos ectomicorrícicos podrían proteger al huésped de la planta durante su crecimiento reduciendo la infección de las plantas por otros microorganismos (Kennedy, 2010). En Yang et al. (2019) se encontró que en los suelos truferos con presencia de ectomicorrizas, la presencia de patógenos era menor que en los que no fueron inoculados con trufa. En concreto, el género patógeno *Fusarium*, que produce toxinas, fue estudiado por Gerlach & Nirenberg (1982) y encontraron menor abundancia en los suelos sin inoculación de *Tuber indicum*.

El resto de lugares presentó unas abundancias relativas bastante similares. Aparecen 6 especies del género *Tuber*, siendo estas *Tuber aestivum*, *Tuber gennadii* Patouillard, *Tuber melanosporum*, *Tuber melosporum* P. Alvarado, G. Moreno, J.L. Manjón & Díez, *Tuber oligospermum* Trappe y *Tuber rufum* Pico. Dentro de las especies, *Tuber melanosporum* es la que más presentó mayor abundancia, seguido de *T. melosporum*, *T. rufum*, *T. oligospermum*, *T. aestivum* y en último lugar *T. gennadii*.

Por otra parte, los resultados también mostraron que en el lugar de muestreo 9 (Figura 6) no hay representantes del reino Bacteria y, en concreto, sólo aparecen los filos de hongos Ascomycota, Basidiomycota, Olpidiomycota y Mucoromycota. Además, este lugar de muestreo, fue el que presentó menor producción de *T. melanosporum* (0.33% de frecuencia de aparición). Esto pudo ser debido a que el establecimiento de la ectomicorriza debe ser estar apoyado por una comunidad bacteriana (Gryndler et al., 2013; Splivallo et al., 2015), aunque se necesitarían estudios más precisos dirigidos a corroborar esta hipótesis con más lugares de muestreo.

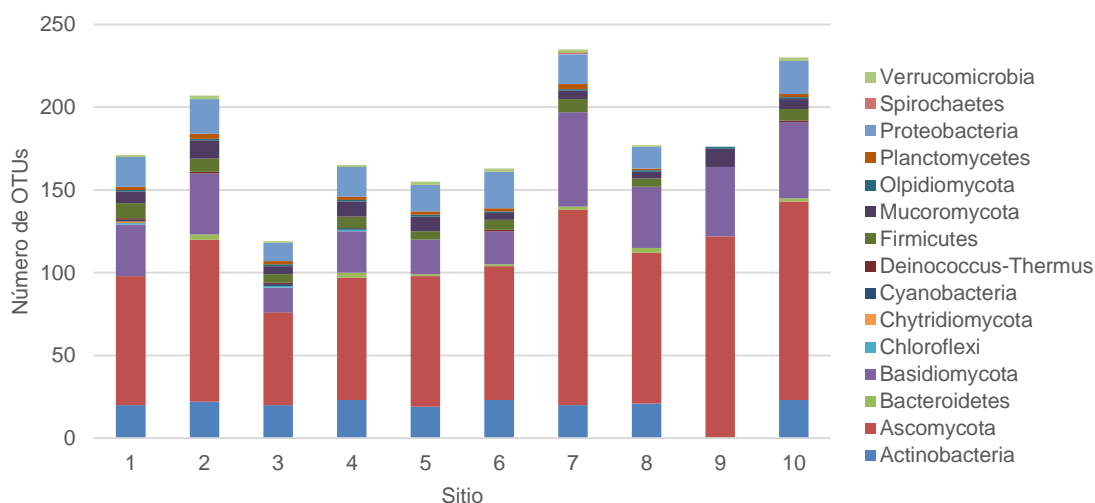


Figura 6 - Riqueza de filos de hongos y bacterias en los diferentes lugares de muestreo.

4.2. Resultados de las relaciones entre especies

4.2.1 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de *Simple matching*

El dendrograma obtenido por el algoritmo *Simple matching* y el método jerárquico aglomerativo de la mínima varianza de *Ward* (Figura 7) mostró que las especies que aparecieron más relacionadas con *Tuber melanosporum* fueron *Rhizobium etli*, *Peyronellaea calorpreferens*, *Singulisphaera acidiphila*, *Legionella amoebal*, *Bipolaris eleusines* e *Ilyonectria robusta* (Clúster 1). En el clúster más próximamente relacionado (Clúster 2) aparecieron *Ascochyta fabae*, *Lycoperdon pratense*, *Nectria Ramulariae*, *Mucor hiemalis*, *Acremonium spinosum* y *Scutellinia torrentis*. Las especies del clúster 3 aparecieron también en el análisis por el método *UPGMA* (Figura 7).

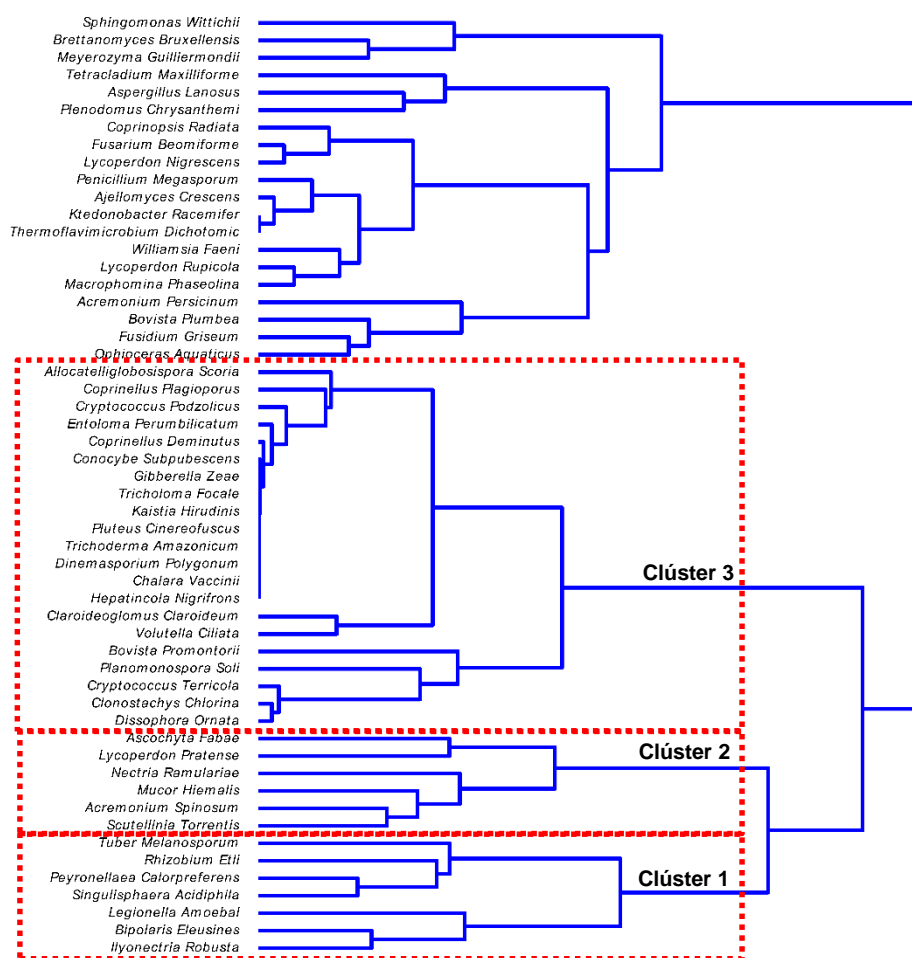


Figura 7 - Dendrograma obtenido por el método aglomerativo Ward y cálculo de disimilitud Simple matching.

Por otro lado, en el dendrograma obtenido por el método jerárquico aglomerativo *UPGMA* (Figura 8), las especies más relacionadas con *Tuber melanosporum* fueron *Rhizobium etli*, *Peyronellaea calorpreferens*, *Singulisphaera acidiphila*, *Legionella amoebal* y *Ascochyta fabae*. Mediante este método, las disimilitudes entre agrupamientos fueron ligeramente diferentes a las obtenidas por el método Ward (Figura 6), ya que el método de *Ward* minimiza la varianza dentro de cada agrupamiento. Las especies inmediatamente relacionados con *T. melanosporum* coincidieron entre ambos métodos,

pero la topología de los agrupamientos contiguos fue algo diferente (Clúster 3), que en el método *UPGMA*, que presentó un nivel de disimilitud más bajo que el obtenido por mínima varianza de *Ward*. Cabe destacar que sea *Rhizobium etli* uno de las especies que más apareció con *Tuber melanosporum*. *Rhizobium* es un género de bacterias más asociado a leguminosas y no tanto a hongos micorrícicos, aportando Nitrógeno en simbiosis con las raíces de dichas plantas (Zahran, 1999). Su presencia puede tratarse a que antes de ser plantaciones truferas, estos lugares de muestreo fueron plantaciones agrícolas por lo que la reminiscencia de los cultivos puede explicar este resultado, aunque estudios de mayores dimensiones deberían corroborar esta hipótesis. El clúster 2 de la figura 7 apareció agrupado en otra posición en el dendrograma, no apareciendo en este caso.

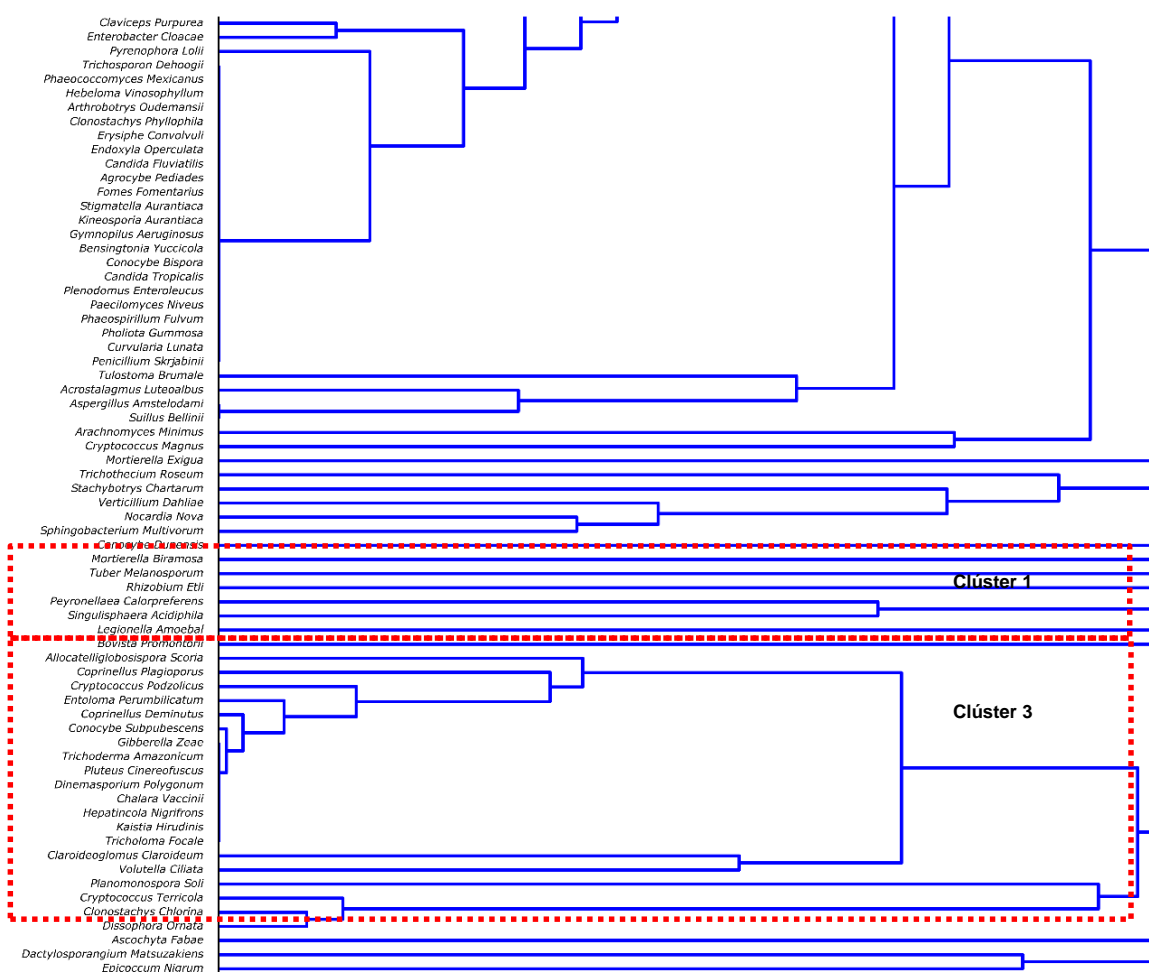


Figura 8 - Dendrograma obtenido por el método aglomerativo *UPGMA* y Simple Matching.

4.2.2 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de Jaccard.

El algoritmo de Jaccard (Figura 9), proporcionó resultados diferentes a los de *Simple matching*, aunque algunos grupos se mantuvieron robustos, presentando una diferente disposición dentro del dendrograma.

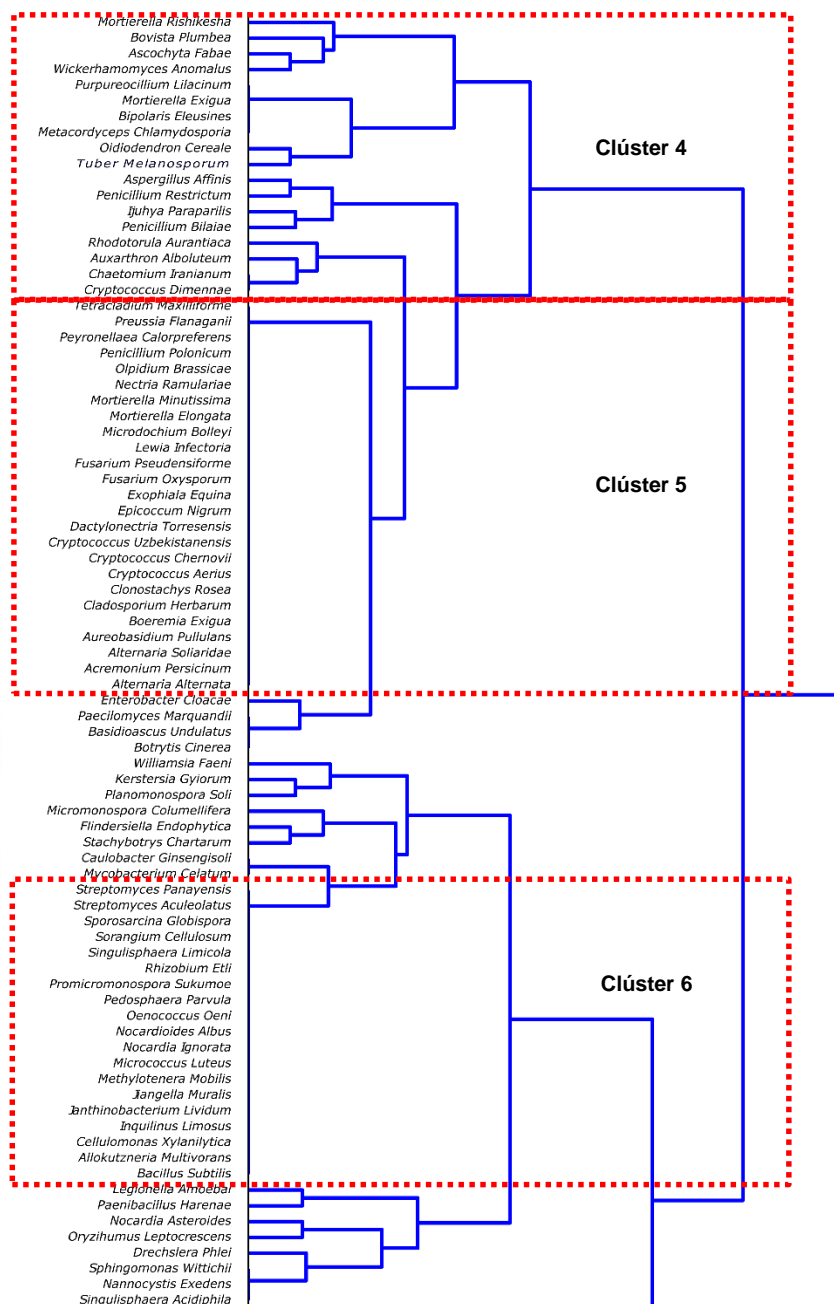


Figura 9 - Dendrograma obtenido mediante el índice Jaccard y el método Ward.

Así, las especies que aparecieron más relacionadas con *Tuber melanosporum* (Clúster 4) fueron *Mortierella rishikeshae*, *Bovista plumbea*, *Ascochyta fabae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Purpureocillium lilacinum*, *Mortierella exigua*, *Bipolaris eleusines*, *Metacordyceps chlamydosporia* y *Oidiodendron cereale*. Inmediatamente después se incluyeron las especies *Aspergillus affinis*, *Penicillium restrictum*, *Ijuhya paraparilis*, *Penicillium bilaiae*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Auxarthron alboluteum*, *Chaetomium iraniamum* y *Cryptococcus dimennae*.

Cabe destacar la presencia de la especie *Paenibacillus harenae*, próxima al clúster 6 (Figura 9). Este género se ha considerado como *mycorrhiza helper bacteria*, que propicia la micorrización de *Lactarius Rufus* en *Pinus sylvestris* (Poole, Bending, Whipps & Read, 2001), lo que podría ser de interés a la hora de intentar favorecer la micorrización de *Tuber melanosporum*. Además, algunos estudios destacan las especies de este género por ser capaces de sintetizar citoquinina (Timmusk, Nicander, Granhall & Tillberg, 1999), fitohormona que promueve el crecimiento de las plantas, considerando a dichas especies estimuladoras del crecimiento de plantas.

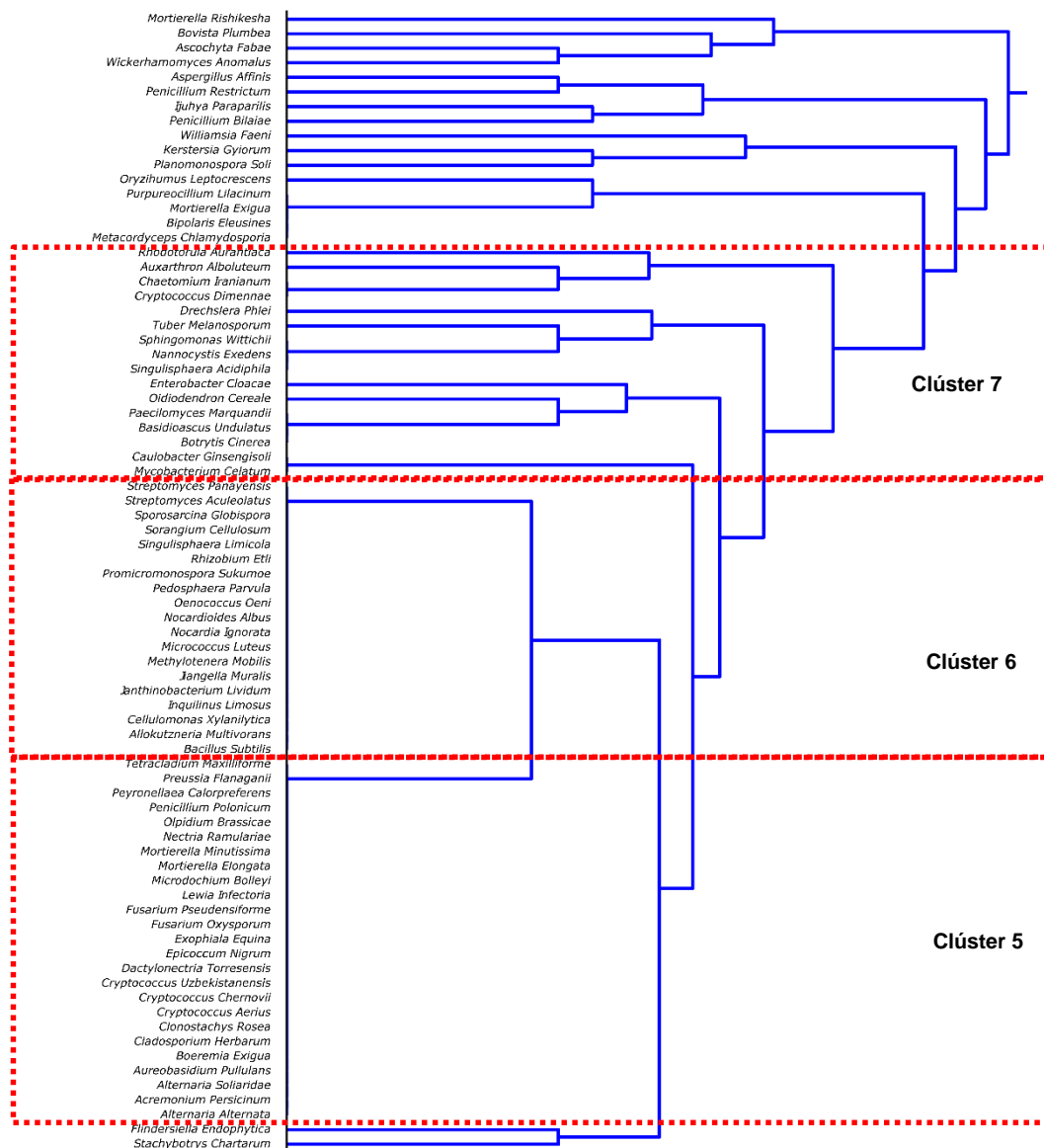


Figura 10 - Dendrograma obtenido mediante el índice Jaccard y el método aglomerativo UPGMA.

Sin embargo, en el dendrograma obtenido por el método jerárquico aglomerativo UPGMA (Figura 10), las especies que aparecieron más íntimamente relacionadas con *Tuber melanosporum* fueron *Rhodotorula aurantiaca*, *Auxarthron alboluteum*, *Chaetomium iranianum*, *Cryptococcus dimennae*, *Drechslera phlei*, *Sphingomonas wittichii*, *Nannocystis exedens*, *Singulisphaera acidiphila*, *Enterobacter cloacae*, *Oidiodendron cereale*, *Paecilomyces marquandii*, *Basidioascus undulatus*, *Botrytis*

cinerea, *Caulobacter ginsengisoli* y *Mycobacterium celatum* (Clúster 7). Los clústeres 5 y 6 (Figuras 9 y 10) son igual entre ambos métodos aglomerativos. Sólo *Ascochyta fabae* es común entre el índice de Jaccard y el *Simple matching* como especie muy íntimamente relacionada con *Tuber melanosporum*. Las diferencias se deben al algoritmo, ya que el de Jaccard inicia los agrupamientos entre especies que tienen la mayor frecuencia de aparición y las especies menos frecuentes se van uniendo a agrupamientos ya establecidos. Sin embargo, el algoritmo *Simple matching* inicia los agrupamientos tanto para especies raras como muy representadas todas los lugares porque incluye en el numerador del coeficiente las ausencias conjuntas de especies (Jackson, Somers & Harvey, 1989).

Cabe destacar la presencia de *Bacillus subtilis* en la zona del clúster 6 (Figuras 9 y 10), ya que el género *Bacillus* se considera *mycorrhiza helper bacteria* (Frey-Klett, Garbaye, & Tarkka, 2007) de especies del género *Laccaria* formando micorrizas con eucaliptos (Dustan et al., 1998), con *Pseudostuga* (Duponnois & Garbaye, 1991) y *Suillus luteus* con *Pinus sylvestris* (Bending, Poole, Whipps, & Read, 2002). También se ha demostrado el potencial de especies de *Bacillus* como biocontrol de patógenos de plantas (Fira, Dimkić, Berić, Lozo, & Stanković, 2018), y en concreto, la capacidad antifúngica mediante lipopéptidos de *Bacillus subtilis* (Cawoy et al., 2015). Las propiedades de esta bacteria podrían favorecer un ambiente propicio para la micorrización o controlando las poblaciones de organismos patógenos.

4.2.3 Dendrogramas obtenidos con el algoritmo de Russell & Rao

Los resultados del dendrograma del algoritmo Russell & Rao presentaron un grupo de especies bastante robusto, que apareció en los dos métodos jerárquicos aglomerativos (Figura 11 y 12).

En el caso del dendrograma obtenido por el método *Ward* (Figura 11), las especies relacionadas con *Tuber melanosporum* fueron *Chaetomium iranianum*, *Cryptococcus dimennae*, *Stachybotrys chartarum*, *Ascochyta fabae*, *Penicillium restrictum*, *Tetracladium maxilliforme*, *Preussia flanaganii*, *Peyronellaea calorpreferens*, *Penicillium polonicum*, *Olpidium brassicae*, *Nectria ramulariae*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella elongata*, *Microdochium bolleyi*, *Lewia infectoria*, *Fusarium pseudensiforme*, *Fusarium oxysporum*, *Exophiala equina*, *Epicoccum nigrum*, *Dactylonectria torresensis*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus chernovii*, *Cryptococcus aerius*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium herbarum*, *Boeremia exigua*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria soliaridae*, *Acremonium persicinum* y *Alternaria alternata*. Mediante este algoritmo, se obtuvo un grupo de especies muy similar entre sí, que es el que aparece desde *Tetracladium maxiliforme* hasta *Alternaria alternata*. Estas especies aparecen todas juntas en el mismo nodo, sin presentar ningún tipo de topología del dendrograma, debido a que aparecen siempre en el mismo lugar y con abundancias muy similares.

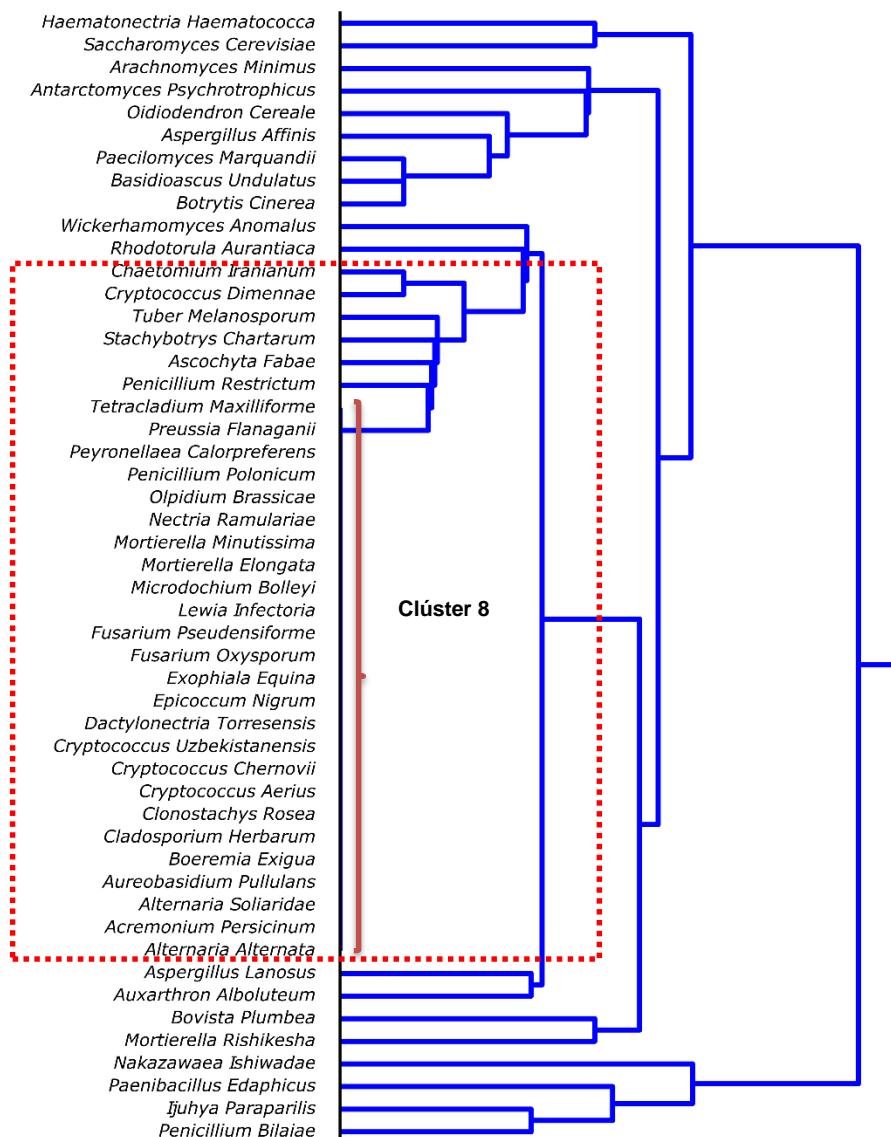


Figura 11 - Dendrograma obtenido por correlación Russell & Rao y método aglomerativo Ward.

Por último, en el dendrograma obtenido por el método jerárquico aglomerativo UPGMA (Figura 12) se observó que la especie *Tuber melanosporum* aparece sola, dentro de un clúster más grande por donde se realizó el corte. En este dendrograma también apareció el grupo de especies que presentan muchas similitudes entre sí y también obtenidas por el método Ward. Esto quiere decir que los resultados obtenidos por ambos métodos aglomerativos son similares y sugieren la robustez de ese grupo de especies al presentarse todas agrupadas. El algoritmo de Russell & Rao se comporta de forma similar al de Jaccard, empezando a formar los grupos por las especies más abundantes (Jackson et al., 1989).

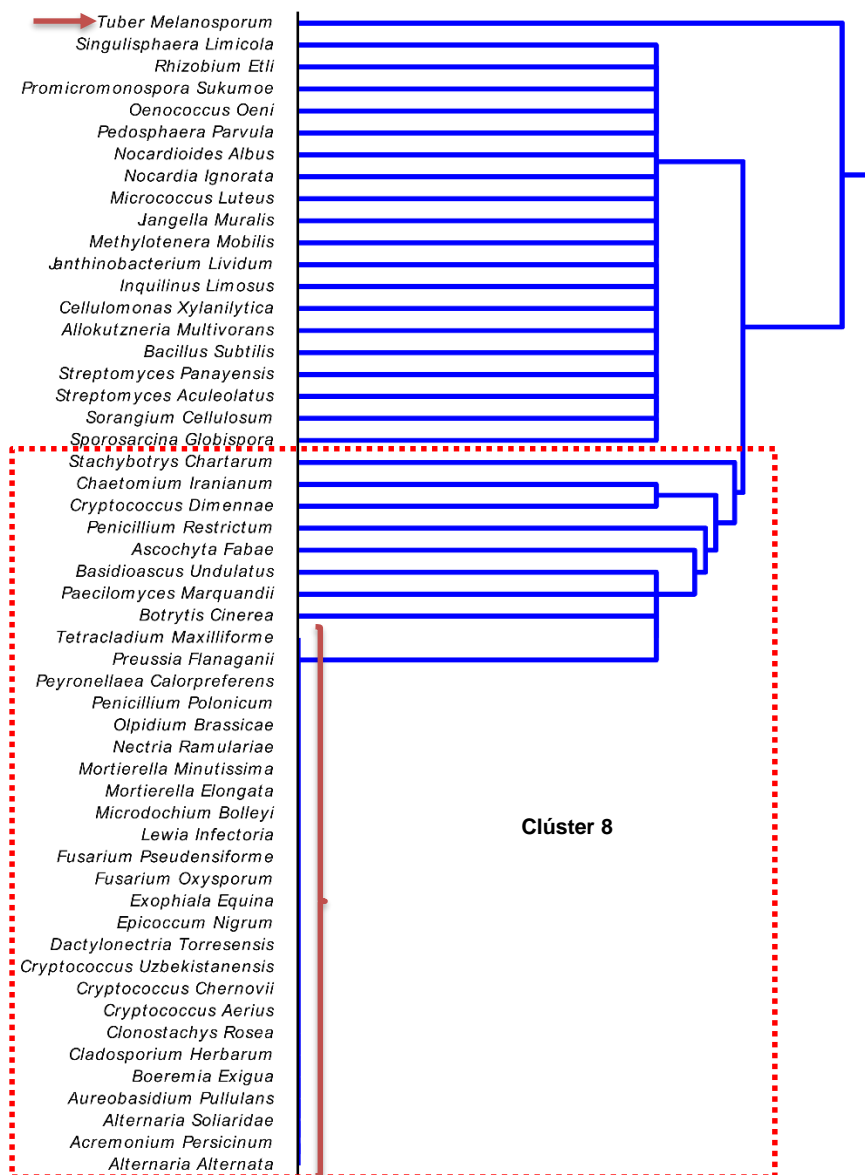


Figura 12 - Dendrograma obtenido por correlación Russell & Rao y método aglomerativo UPGMA.

Por tanto, consideramos que este algoritmo representó mejor las relaciones de *T. melanosporum* con el resto de organismos del suelo, ya que mediante ambos métodos jerárquicos se obtuvieron las mismas especies íntimamente relacionadas. Muchas de las especies que aparecieron junto a la trufa negra también aparecieron en los resultados obtenidos mediante el coeficiente de Jaccard, lo que sugirió cierta estructura de grupo, es decir, correlación entre estos organismos y *T. melanosporum*.

Entre los organismos relacionados con *T. melanosporum* en estos suelos aparecieron varios representantes del género *Mortierella* [género de hongos saprófitos del filo Mucoromycota] y especies del género *Fusarium* [hongos filamentosos saprófitos y patógenos facultativos de animales y plantas pertenecientes al filo Ascomycota (Booth, 1971)]. En concreto, la especie de *Fusarium* que apareció con mayor abundancia fue *F. oxysporum*, un importante hongo cosmopolita fitopatógeno (Smith et al. 1988). En otros estudios, se relacionaron especies del género *Mortierella* y la especie *Fusarium*

oxysporum con lugares productivos de *Tuber magnatum* (Mello et al., 2010), lo que concuerda con nuestros resultados.

También aparecieron relacionados con la trufa negra varias especies del género *Alternaria*. Es uno de los patógenos de plantas más importantes dentro de los hongos Ascomycota (Rotem, 1994). *Penicillium polonicum* y *P. restrictum* fueron las especies del género Ascomycota que más abundancia presentaron en estos suelos y que estuvieron presentes en todos los lugares de muestreo, corroborándose que este género de hongos es muy abundante en el suelo, también en las trufas. En relación a las especies del género *Cryptococcus*, hongos patógenos, aparecieron 17 especies de este género y las más abundantes fueron *Cryptococcus aerius*, *C. chernovii*, *C. dimennae* y *C. uzbekistanensis* junto con *T. melanosporum*. Por otra parte, la especie *Ascochyta fabae* apareció en todos los dendrogramas. Las especies de este género Ascomycota son fitopatógenos de la familia *Poaceae* y *Fabaceae* (gramíneas y leguminosas, respectivamente). En concreto, *Ascochyta fabae* es patógena de *Vicia faba* L. (haba) (Roman et al., 2003). Por otro lado, según el algoritmo Russell & Rao, *Bacillus subtilis* apareció como especie muy relacionada, además de especies del género *Streptomyces* y *Cellulomonas*, pertenecientes al filo Actinobacteria. Similarmente, apareció mediante este algoritmo *Rhizobium etli*, lo que concuerda con los resultados del algoritmo de *Simple Matching* y de *Ward*. Este resultado pudo deberse a que esta especie es abundante por sí sola y no influya en la micorrización de *T. melanosporum*. En este sentido, estudios más amplios serían necesarios para contrastar esta hipótesis. Uno de los efectos ecológicos más peculiares de *Tuber melanosporum* es la formación de áreas sin vegetación en el entorno de la planta denominado quemado (Mello et al., 2010). Éste es un efecto alelopático del micelio del hongo que inhibe el crecimiento de especies herbáceas alrededor del hospedante. El hecho de que aparezcan tantos taxones fitopatógenos puede estar relacionado con este efecto alelopático que debilita las plantas herbáceas y por tanto pueden ser más susceptibles a las afecciones por patógenos, haciendo un efecto sinérgico con *Tuber melanosporum* en la inhibición completa del crecimiento de organismos vegetales en esa área de quemado.

Este estudio ha permitido avanzar en la caracterización de las relaciones entre especies en las plantaciones de trufa. Así como las relaciones entre organismos están bien descritas y claras en la ecología de organismos macroscópicos (Montoya et al., 2006) como animales y plantas (Bascompte, Jordano, Melián & Olesen, 2003), o en el caso de las relaciones mutualistas (debido a su impacto en la competitividad dentro de una comunidad y en el aumento de la diversidad biológica (Bastolla et al., 2009)), hay menos estudios llevados a cabo a nivel microbiológico debido a su gran biodiversidad y en muchos casos la imposibilidad de realizar cultivos para su estudio (Fuhrman, 2009; Raes & Bork, 2008; Ruan et al., 2006). En el caso concreto de la trufa negra (*Tuber melanosporum*), el número de estudios es muy limitado (Antony-Babu et al., 2014; Mello et al., 2013; Splivallo et al., 2015) por lo que los resultados de este trabajo son vitales para empezar a estudiar a detalle determinadas relaciones que pueden permitir aumentar la productividad de las plantaciones trufas.

Un ecosistema es un sistema complejo en el que varias especies interactúan entre sí para formar complejas redes. A través de estas interacciones en red, un ecosistema es capaz de cumplir funciones a nivel sistémico (por ejemplo, el ciclo de nutrientes, la estabilidad del ecosistema) que no podrían ser logradas por poblaciones aisladas e individuales (Montoya et al., 2006). En este trabajo, los resultados obtenidos, muestran

algunas evidencias de cierta estructura de grupos o redes de estas comunidades microbianas del suelo. Los resultados del dendrograma, al contrario que los usados en filogenia, no muestran relaciones de parentesco, sino que muestran relaciones de unión. La importancia de usar este tipo de herramientas o técnicas de aprendizaje automático (*machine learning*) ha permitido manejar una gran cantidad de datos y realizar análisis de agrupamientos y relaciones entre estos organismos. Estas técnicas pretenden, mediante el desarrollo de algoritmos, encontrar patrones, analizar agrupamientos de los datos, realizar clasificaciones y evaluar modelos todo a partir de los datos existentes (Tarca, Carey, Chen, Romero & Drăghici, 2007). *Machine learning* es una técnica que permite realizar tareas de agrupamiento de los datos o predicciones mediante programación y reducir al mínimo la necesidad de introducción humana de datos, mecanizando y automatizando al máximo el proceso.

5. – CONCLUSIONES

1. Las comunidades microbianas de estos lugares de muestreo estaban dominadas por los filos: Ascomycota, Basidiomycota, Actinobacteria y Proteobacteria. Los géneros de hongos más abundantes fueron *Tuber*, *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Mortierella*, *Lewia* y *Peyronaella*.

2. El dendrograma que mejor explica las relaciones de *Tuber melanosporum* con el resto de organismos es el obtenido mediante el coeficiente de Russell & Rao y el método Ward.

3. Los organismos más relacionados con *T. melanosporum* son hongos Ascomycota del suelo, hongos filamentosos, levaduras y fitopatógenos de plantas. La comunidad que acompaña a la trufa en los lugares de muestreo es: *Chaetomium iraniamum*, *Cryptococcus dimennae*, *Stachybotrys chartarum*, *Ascochyta fabae*, *Penicillium restrictum*, *Tetracladium maxilliforme*, *Preussia flanaganii*, *Peyronellaea calorpreferens*, *Penicillium polonicum*, *Olpidium brassicae*, *Nectria ramulariae*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella elongata*, *Microdochium bolleyi*, *Lewia infectoria*, *Fusarium pseudensiforme*, *Fusarium oxysporum*, *Exophiala equina*, *Epicoccum nigrum*, *Dactylonectria torresensis*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus chernovii*, *Cryptococcus aerius*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium herbarum*, *Boeremia exigua*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria soliaridae*, *Acremonium persicinum* y *Alternaria alternata*.

4. El avance en la caracterización de estas comunidades mejora la comprensión de las relaciones de *T. melanosporum* con otras especies, algunas de ellas con un posible efecto sinérgico. Este conocimiento abre las puertas a un mayor control de las comunidades de microorganismos en plantaciones trufas y a la aplicación de algunos de ellos con este fin.

6.- AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Jaime Olaizola y a IDForest la oportunidad de poder realizar este estudio como mi trabajo de fin de máster. A mis tutoras, Celia por su apoyo en los análisis y redacción del trabajo, y enseñanza en la rigurosidad; a Elena por añadir una perspectiva biológica, darme tantos consejos y enseñarme técnicas de comunicación y a redactar un artículo científico. A James, por su colaboración en las técnicas de machine learning y programación en Python. A mis compañeros del máster, Diego por apoyarme día a día e interesarse por los análisis realizados; a Luisa por darme su apoyo y corregirme mi falta de redacción. A mis padres por haberme dado la oportunidad de estudiar este máster en Palencia. A Carmen por brindarme todo su apoyo en el día a día. Este estudio ha sido posible gracias al Instituto para la Competitividad Empresarial of Castilla y León por la ayuda de investigación ICE-IDI-2018-2011818860 del programa de prácticas en Investigación, Desarrollo e Innovación e internacionalización y al proyecto RISE "3D-NEONET" (GA:734907), financiado por el programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea.

8- REFERENCIAS

- Antony-Babu, S., Deveau, A., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C., ... Uroz, S. (2014). Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2831–2847. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12294>
- B. Leschine, S. (2009). CELLULOSE DEGRADATION IN ANAEROBIC ENVIRONMENTS, 399–426.
- Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., ... Stocchi, V. (2005). New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.027>
- Barbieri, E., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Potenza, L., Basaglia, M., ... Stocchi, V. (2010). New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biology*, 114(11–12), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.001>
- Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux, J., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Ceccaroli, P., ... Stocchi, V. (2007). Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2234–2246. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01338.x>
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C. J., & Olesen, J. M. (2003). The nested assembly of plant–animal mutualistic networks, 100(16), 9383–9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633576100>
- Bastolla, U., Fortuna, M. A., Pascual-García, A., Ferrera, A., Luque, B., & Bascompte, J. (2009). The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity. *Nature*, 458(7241), 1018–1020. <https://doi.org/10.1038/nature07950>
- Bending, G. D., Poole, E. J., Whipps, J. M., & Read, D. J. (2002). Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00215-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00215-X)
- Bertaux, J., Schmid, M., Hutzler, P., Hartmann, A., Garbaye, J., & Frey-Klett, P. (2005). Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environmental Microbiology*, 7(11),

1786–1795. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00867.x>

Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, *98*(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>

Buscot, F., Munch, J. C., Charcosset, J. Y., Gardes, M., Nehls, U., & Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(5), 601–614. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00048-6)

Buzzini, P., Gasparetti, C., Turchetti, B., Cramarossa, M. R., Vaughan-Martini, A., Martini, A., ... Forti, L. (2005). Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Archives of Microbiology*, *184*(3), 187–193. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0043-y>

Caldwell, M. M. (2017). *Ecological Studies 230: Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (Vol. 230). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3>

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, *8*(2), 281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>

Duponnois, R., & Garbaye, J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Annales Des Sciences Forestières*, *48*(3), 239–251.

Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, *285*(February), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

Frey-Klett, P., Garbaye, J., & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, *176*(1), 22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>

Fu, Y., Xiaolin, L., Quiang, L., Haowei, W., Chuan, X., Qi, G., ... Qun, S. (2016). Soil microbial communities of three major Chinese truffles in Southwest China. *Canadian Journal of Microbiology*, (June), 348–349.

Fuhrman, J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, *459*(7244), 193–199. <https://doi.org/10.1038/nature08058>

- Geml, J., Gravendeel, B., Van Der Gaag, K. J., Neilen, M., Lammers, Y., Raes, N., ... Noordeloos, M. E. (2014). The contribution of DNA metabarcoding to fungal conservation: Diversity assessment, habitat partitioning and mapping red-listed fungi in protected coastal *Salix repens* communities in the Netherlands. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099852>
- Geml, J., Pastor, N., Fernandez, L., Pacheco, S., Semenova, T. A., Becerra, A. G., ... Nouhra, E. R. (2014). Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Molecular Ecology*, 23(10), 2452–2472. <https://doi.org/10.1111/mec.12765>
- Gryndler, Milan, Soukupová, L., Hřelová, H., Gryndlerová, H., Borovička, J., Streiblová, E., & Jansa, J. (2013). A quest for indigenous truffle helper prokaryotes. *Environmental Microbiology Reports*, 5(3), 346–352. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12014>
- Gryndler, Milana, & Hřelová, H. (2013). Isolation of bacteria from ectomycorrhizae of *Tuber aestivum* Vittad. *Acta Mycologica*, 47(2), 155–160. <https://doi.org/10.5586/am.2012.018>
- Hall, I., Brown, G., & Zambonelli, A. (2008). Taming the Truffle. *Inoculum*, 59(July), 69.
- J.M. Bohannon, B., & E. Lenski, R. (2000). Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecology Letters*, 3(4), 362–377. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00161.x>
- Jackson, D. A., Somers, K. M., & Harvey, H. H. (1989). Similarity coefficients: measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence? *The American Naturalist*, 133(3), 436–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/284927>
- Jones E, Oliphant E, Peterson P, et al. SciPy: Open Source Scientific Tools for Python, 2001-, <http://www.scipy.org/> [Online; accessed 2019-07-15].
- Lidicker, W. Z. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. *BioScience*, 29(8), 475–477. <https://doi.org/10.2307/1307540>
- Linde, C. C., & Selmes, H. (2012). Genetic Diversity and Mating Type Distribution of *Tuber melanosporum* and Their Significance to Truffle Cultivation in Artificially Planted Truffières in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6534–6539. <https://doi.org/10.1128/aem.01558-12>
- Martin, F., Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., & Lapeyrie, F.

- (2001). Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis : signals and communication genes. *New Phytologist*, 145–154.
- Mediavilla, O., Geml, J., Olaizola, J., Oria-de-Rueda, J. A., Baldrian, P., & Martín-Pinto, P. (2019). Effect of forest fire prevention treatments on bacterial communities associated with productive *Boletus edulis* sites. *Microbial Biotechnology*, (2018), 1751-7915.13395. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13395>
- Mello, A., Ding, G. C., Piceno, Y. M., Napoli, C., Tom, L. M., DeSantis, T. Z., ... Bonfante, P. (2013). Truffle Brûlés Have an Impact on the Diversity of Soil Bacterial Communities. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061945>
- Mello, A., Murat, C., & Bonfante, P. (2006a). Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiology Letters*, 260(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00252.x>
- Mello, A., Murat, C., & Bonfante, P. (2006b). Truffles: Much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiology Letters*, 260(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00252.x>
- Montoya, J. M., Pimm, S. L., & Solé, R. V. (2006). Ecological networks and their fragility. *Nature*, 442(7100), 259–264. <https://doi.org/10.1038/nature04927>
- Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7>
- Nardinia, A., Salleo, S., Tyree, M. T., & Vertovec, M. (2000). Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings . *Annals of Forest Science*, 57(4), 305–312. <https://doi.org/10.1051/forest:2000121>
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., ... Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Pacioni, G., Leonardi, M., Aimola, P., Ragnelli, A. M., Rubini, A., & Paolocci, F. (2007). Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. *Mycological Research*, 111(12), 1450–1460. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.016>

- Poole, E. J., Bending, G. D., Whipps, J. M., & Read, D. J. (2001). Ectomycorrhizas and Their Effects on Mycorrhiza Formation in Vitro. *New Phytologist*, 743–751.
- Raes, J., & Bork, P. (2008). Molecular eco-systems biology: Towards an understanding of community function. *Nature Reviews Microbiology*, 6(9), 693–699. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1935>
- Read, D. J. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47, 376–391. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90100-B](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90100-B)
- Rivera, C. S., Blanco, D., Oria, R., & Venturini, M. E. (2010). Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiology*, 27(2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.001>
- Ruan, Q., Dutta, D., Schwalbach, M. S., Steele, J. A., Fuhrman, J. A., & Sun, F. (2006). Local similarity analysis reveals unique associations among marine bacterioplankton species and environmental factors. *Bioinformatics*, 22(20), 2532–2538. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl417>
- Sbrana, C., Agnolucci, M., Bedini, S., Lepera, A., Toffanin, A., Giovannetti, M., & Nuti, M. P. (2002). Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00712-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00712-7)
- Smith IM, Dunez J, Phillips DH, Lelliott RA, Archer SA. 1988. European handbook of plant diseases. *Oxford: Blackwell Scientific*.
- Splivallo, R., Vahdatzadeh, M., Maciá-Vicente, J. G., Molinier, V., Peter, M., Egli, S., ... & Deveau, A. (2019). Orchard conditions and fruiting body characteristics drive the microbiome of the black truffle *Tuber aestivum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1437.
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., & Karlovsky, P. (2015). Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2647–2660. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521>
- Tarca, A. L., Carey, V. J., Chen, X. wen, Romero, R., & Drăghici, S. (2007). Machine learning and its applications to biology. *PLoS Computational Biology*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030116>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., ...

- Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1256688>
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217–263. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>
- Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., & Tillberg, E. (1999). Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13), 1847–1852. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00113-3)
- Wardle, D. A., & Lindahl, B. D. (2014). Ecology. Disentangling global soil fungal diversity. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1052–1053. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1185>
- Yang, M., Zou, J., Liu, C., Xiao, Y., Zhang, X., Yan, L., ... Li, X. (2019). Chinese white truffles shape the ectomycorrhizal microbial communities of *Corylus avellana*. *Annals of Microbiology*, 69(5), 553–565. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-1445-4>
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(4), 968–989, table of contents. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585971> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98982>
- Zhang, X., Ye, L., Kang, Z., Zou, J., Zhang, X., & Li, X. (2019). Mycorrhization of *Quercus acutissima* with Chinese black truffle significantly altered the host physiology and root-associated microbiomes. *PeerJ*, 7, e6421. <https://doi.org/10.7717/peerj.6421>