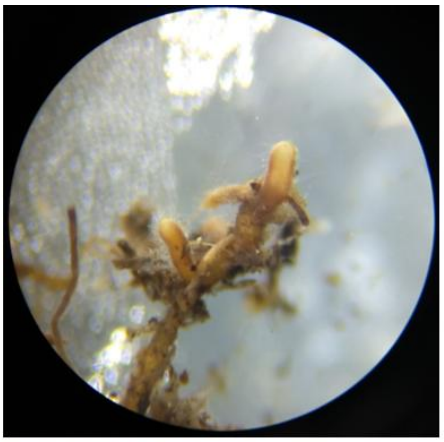
Efectos de la fertilización en la micorrización con *Tuber* spp. y en la calidad de planta de distintas quercíneas: comparación entre fertilizantes orgánicos y convencionales

Máster en Restauración de Ecosistemas



Presentado por: **María Rinaudo Martín**

Directora Académica: **María Mercedes Uscola Fernández**

2020

Índice

Resumen 2

Abstract 3

Introducción 4

Materiales y métodos 9

Material vegetal y esporocarpos o "trufas" de Tuber spp. 9

Semillado y cultivo en vivero previo a la fertilización 10

Inoculación 12

Fertilización 12

Caracterización morfológica, estado de micorrización y variables fisiológicas en plantas 14

Análisis estadísticos 16

Resultados 17

Evolución de las plantas durante el cultivo 17

Desarrollo y micorrización de las plantas al final del cultivo 24

Características químicas en el extracto acuoso del sustrato a lo largo del cultivo ... 27

Discusión 30

Efectos de la fertilización y de las fuentes de N en la calidad de planta 30

Efectos de la micorrización con T. melanosporum y T. aestivum 32

Futuras líneas de investigación 34

Conclusiones 35

Agradecimientos 36

Referencias 36

Efectos de la fertilización en la micorrización con *Tuber* spp. y en la calidad de planta de distintas quercíneas: comparación entre fertilizantes orgánicos y convencionales

Resumen

La revegetación es una práctica clave en la restauración de ecosistemas. Maximizar la calidad de planta producida en vivero incrementa su éxito en las revegetaciones. La calidad de planta se puede optimizar especialmente con fertilización, pero también mediante micorrización. Además, la micorrización con *Tuber* spp. aportaría incentivos económicos. Es necesario definir estrategias que permitan utilizar ambas técnicas simultáneamente. La fuente de nitrógeno (N) utilizada en la fertilización podría facilitar la compatibilización de ambas técnicas. El N orgánico, por su menor coste metabólico y su aporte extra de carbono, podría favorecer tanto a la planta como a la micorriza, reduciendo los impactos negativos del N inorgánico. Se desarrolló un experimento factorial completo con dos especies arbóreas (*Quercus faginea* y *Q. ilex*), tres tipos de inóculo (sin inóculo e inoculadas con *Tuber melanosporum* o *T. aestivum*) y tres fertilizantes según la fuente de N (sin fertilizante, fertilizante con N orgánico y con N inorgánico o convencional). Se midieron parámetros morfofisiológicos en la planta durante el cultivo y al final del primer año de crecimiento, así como el nivel de micorrización y la evolución de características del sustrato del cultivo. En ambas quercíneas, el N orgánico promovió el desarrollo morfofisiológico de las plantas al mismo nivel que el N inorgánico, por lo que el fertilizante con N orgánico es una alternativa viable en los programas de fertilización. Las quercíneas mostraron una respuesta similar a las fuentes de N, siendo las diferencias ligeramente más acusadas en *Q. faginea*. Aunque no se encontró micorrización, sí que se detectaron indicios y su ausencia se atribuyó al corto periodo de tiempo del experimento más que a efectos inhibitorios del fertilizante. Los resultados sugieren que emplear fertilizantes en plantas micorrizadas podría aumentar la calidad de planta sin reducir el nivel de micorrización, especialmente si el fertilizante es N orgánico.

Palabras clave: nitrógeno inorgánico, nitrógeno orgánico, *Quercus faginea*, *Quercus ilex*, *Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum*.

Fertilization effects on mycorrhization with *Tuber* spp. and on plant quality of different quercines: comparison between organic and conventional fertilizers

Abstract

Revegetation is a key practice in ecosystem restoration. Maximizing plant quality in the nursery increases its success after planting in the field. Plant quality can be optimized especially by fertilization but also by mycorrhization. Furthermore, mycorrhization with *Tuber* spp. would provide financial incentives. It is necessary to define protocols that allow to use both techniques simultaneously. The nitrogen (N) source used in the fertilizer could facilitate the compatibility of both techniques. Organic N due to lower metabolic cost and extra carbon supply would maximize both plant quality and micorrhizal colonization minimizing the negative impacts of inorganic N. A complete factorial experiment was developed with two tree species (*Quercus faginea* and *Q. ilex*), three types of inoculum (without inoculum and inoculated with *Tuber melanosporum* or *T. aestivum*) and three fertilizers according to the N source (without fertilizer, fertilizer with organic N and with inorganic N or conventional). Morphophysiological parameters were measured in the plant during cultivation and at the end of the first year of growth, as well as the level of mycorrhization and the evolution of characteristics of the substrate. In both quercines, organic N promoted the seedlings morphophysiological development at the same level as inorganic N, yet fertilizer with organic N is a viable alternative in fertilization programs. Quercines had similar response to N sources, being the differences to N forms slightly bigger in *Q. faginea*. Furthermore, although mycorrhization was not found, signs were detected and its absence was attributed to the short period of the experiment rather than to inhibitory effects of the fertilizer. The results suggest that using fertilizers on mycorrhized plants could increase plant quality without reducing the level of mycorrhization, especially if the used fertilizer is based on organic N.

Key words: Inorganic nitrogen, organic nitrogen, *Quercus faginea*, *Quercus ilex*, *Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum*.

Introducción

La restauración de ecosistemas forestales es una de las mayores prioridades ambientales actuales a nivel mundial. Tras la descontaminación del medio o el acondicionamiento geomorfológico, en caso de ser necesarios, la revegetación culmina la restauración ecológica siendo, por tanto, una de las prácticas más empleadas (Vargas Ríos 2011), y jugando un papel esencial para el éxito de la restauración (Stanturf et al. 2014). La restauración y, en concreto, la revegetación, aportan numerosos servicios ecosistémicos, tanto ecológicos (fijación del suelo, retención de nutrientes, hábitat y alimento para otras especies, etc.) como económicos (aprovechamiento maderero, alimenticio, recreativo, etc.) (Rey Benayas et al. 2009; Cortina et al. 2011). Sin embargo, los ecosistemas mediterráneos están especialmente limitados por su xericidad estival, con altas temperaturas y bajas precipitaciones lo que, generalmente, conlleva una alta tasa de mortalidad en las revegetaciones (Cortina et al. 2004). Además, esta xericidad se verá incrementada paulatinamente en toda la región mediterránea a causa de los efectos del cambio climático (Lionello et al. 2006; Giorgi and Lionello 2008). Maximizar la calidad de planta incrementa el éxito de las revegetaciones, ya que favorece el establecimiento, crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas en el campo y aumenta su capacidad de tolerar distintos factores de estrés (Villar-Salvador et al. 2012, 2015; Grossnickle 2018; Grossnickle and MacDonald 2018a). Por ello, para aumentar el éxito de las revegetaciones, en especial en el contexto de cambio climático, es clave optimizar la calidad de planta producida en vivero.

La micorrización de las plantas en vivero con especies de hongo concretas está cobrando mayor importancia en la actualidad, ya que varios estudios demuestran la mayor supervivencia de plantas micorrizadas tras el primer año de plantación (Bonet et al., 2006; Dominguez Núñez et al., 2008; Domínguez Núñez et al., 2009). La micorriza favorecería a la planta adquiriendo recursos del suelo y transfiriéndoselos a la planta, aumentando el volumen de suelo explorado. De hecho, en campo se ha encontrado que ciertas especies de micorrizas reducen el estrés hídrico estival y favorecen la absorción de nutrientes limitantes como fósforo y nitrógeno (Bonet et al., 2006; Dominguez Núñez et al., 2008; Domínguez Núñez et al., 2009). Sin embargo, la micorriza exige un alto requerimiento de carbono (C) a la planta, especialmente en los primeros meses tras la inoculación, sin aportar beneficio a cambio durante la

colonización, hasta no ser completamente funcional y establecerse la micorrización efectiva (Le Tacon et al. 2013). Si bien la micorrización favorece el desarrollo de las plantas en vivero y la supervivencia en plantaciones forestales (Bonet et al., 2006; Dominguez Núñez et al., 2008; Domínguez Núñez et al., 2009), el efecto de la fertilización de la planta en vivero es comparativamente más beneficioso que la micorrización o la nodulación con bacterias fijadoras de N (Villar-Salvador et al. 2008; Garcia-Barreda et al. 2017). Por otro lado, la fertilización puede alterar las condiciones del sustrato, como pH y salinidad, excediendo los niveles de tolerancia del hongo concreto usado en la inoculación y, por tanto, inhibir el proceso de micorrización (Díaz et al. 2009; Idol and Diarra 2016). Por ello, las plantas micorrizadas rara vez se fertilizan, lo que reduce la calidad de planta. En cambio, la fertilización favorece el desarrollo de maquinaria fotosintética en la planta (Warren et al. 2000; Chen et al. 2016) y, por tanto, una mayor capacidad de producción de carbohidratos que podría aliviar el gasto extra de C destinado a la micorriza en los primeros momentos de su desarrollo y maximizar su desarrollo posterior, aumentando la calidad de la micorrización (Le Tacon et al. 2013). Con el fin de maximizar la calidad de planta sin perjudicar el desarrollo de la micorriza, es crítico conciliar ambas técnicas.

Para la micorrización se puede utilizar un gran número de especies de hongos. Algunas especies de micorrizas forman fructificaciones comestibles, como las trufas pertenecientes al género *Tuber*, lo que les dota de un valor económico añadido (Zambonelli et al. 2016). En las últimas décadas, como consecuencia del interés social, las plantaciones con plantas micorrizadas con trufa se han extendido por todo el mundo, lo que ha diversificado los cultivos y los ingresos para los agricultores locales (Bonet et al., 2006; Reyna y García-Barreda, 2008; Samils et al., 2008). Las plantaciones de trufas ayudan a transformar los paisajes agrícolas en productivos ecosistemas agroforestales con alto valor agregado, proporcionando ayuda a regiones propensas a incendios y aumentando la biodiversidad en comparación con la agricultura intensiva (Therville et al. 2013). Esta forma de agroforestería también ayuda a mitigar el cambio climático a través del secuestro de carbono y otros servicios ecosistémicos, como la mejora de la calidad del agua y del suelo (Chen et al. 2016). Al ser unos recursos naturales tan únicos e importantes, la micorrización con trufa merece ser estudiada con el fin de aumentar la calidad de planta en las revegetaciones y para aportar un incentivo económico en la producción local.

De entre las especies de hongo del genero *Tuber*, *T. melanosporum* o la trufa negra, es la trufa de mayor valor económico (Reyna and Garcia-Barreda 2014). Sin embargo, la trufa negra tiene una distribución limitada, localizándose principalmente en regiones mediterráneas y continentales de Francia, Italia y España (Aumeeruddy-Thomas et al. 2016; Chen et al. 2016), aunque la utilización de plantas inoculadas la han extendido a otras regiones del mundo (Aumeeruddy-Thomas et al. 2016; Chen et al. 2016; Zambonelli et al. 2016). Además, requiere condiciones climáticas y de suelo muy estrictas, prefiriendo pH básicos (Reyna and Garcia-Barreda 2014; Chen et al. 2016). A diferencia de *T. melanospurum*, *T. aestivum*, trufa de Borgoña o trufa de verano, tiene una distribución más amplia y se puede encontrar por toda Europa en hábitats con mayor amplitud ecológica (Gryndler et al. 2017), siendo tolerante a mayor diversidad de condiciones climáticas (Stobbe et al. 2013; Zambonelli et al. 2016). También muestra mayor diversidad morfológica y fenológica, lo que se traduce en un mayor periodo productivo (Benucci et al. 2012). Además, *T. aestivum*, después de *T. melanosporum*, es una de las especies de trufa más buscadas por su valor monetario (Benucci et al. 2012). La amplia gama de posibles suelos y climas, junto con su valor de mercado y su larga temporada de cosecha, hace que esta especie sea interesante para el cultivo y una gran alternativa a *T. melanosporum*, especialmente en zonas donde esta última no pueda ser utilizada. Por ello, es necesario estudiar varias especies de *Tuber* que permita expandir la posible área de utilización de las plantaciones truferas al mayor territorio geográfico y a la mayor diversidad de condiciones ambientales.

Las trufas tienen una gran cantidad de especies de plantas hospedadoras, como *Quercus*, *Corylus*, *Populus* o *Pinus*, entre otras (Zambonelli et al. 2016), lo que permite su cultivo en múltiples ambientes. Por tanto, para su uso en truficultura, hay que considerar tanto los requisitos del hongo como de la planta hospedadora. Además, según la especie de planta, esta tiene distinto potencial de producción de trufa (Zambonelli et al. 2016). Por otro lado, el cambio climático parece estar teniendo efectos en la distribución y fructificación de trufas, si bien el efecto depende del par hongo-planta (Hall et al. 2003; Büntgen et al. 2012). Por ello, es esencial estudiar la micorrización con distintas especies de trufa en paralelo con distintas especies de planta hospedadora. Aunque se pueden emplear múltiples especies de plantas hospedadoras, las más utilizadas en el cultivo de trufa son las quercíneas y, especialmente, *Q. ilex* o encina (Reyna and García-Barreda 2008). Sin embargo, cada vez se empiezan a utilizar

más otras especies como *Q. faginea*, *Castanea sativa* o *Colylus avellana* (Reyna and García-Barreda 2008; Álvarez-Lafuente et al. 2018). De hecho, la producción de trufa en ambientes naturales es mayor cuando la especie es *Q. faginea* que cuando es *Q. ilex* (García-Montero et al. 2007). *Quercus ilex* es una especie perenne, con una amplia distribución de hábitats y más tolerante al estrés hídrico y a la temperatura que *Q. faginea* (Martín Herrero et al. 2004; Villar-Salvador et al. 2014), siendo la especie con los márgenes de tolerancia climática más amplios de los árboles de España (Villar-salvador et al. 2014; Villar-Salvador et al. 2014). Por el contrario, *Q. faginea* es una especie de hoja caduca, que tiene una distribución más reducida, debido a su menor tolerancia a la sequía estival y a las variaciones de temperatura, que *Q. ilex* (Villar-salvador et al. 2014; Villar-Salvador et al. 2014). Por otro lado, *Q. ilex* es una especie ampliamente utilizada en la reforestación en la Península Ibérica (Rodà et al. 1999; Rey Benayas and Camacho-Cruz 2004). Si bien *Q. faginea* es menos utilizada en reforestación, tiene un gran potencial en las zonas menos secas, como las zonas de mayor altitud en zonas continentales (Domínguez-Lerena et al. 2001). Además, *Q. ilex* es una especie de crecimiento más lento que *Q. faginea*, (Villar-Salvador et al., 2013; Uscola et al., 2015) y mucho menos plástica en su respuesta a factores ambientales, incluida la disponibilidad de nutrientes (Villar-Salvador et al., 2013; Uscola et al., 2014, 2015). Así, con el fin de aumentar la posible utilización de plantaciones truferas a distintos contextos ambientales maximizando su producción, es necesario estudiar múltiples especies hospedadoras, como *Q. ilex* y *Q. faginea*, en un marco comparativo.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, la técnica más empleada para aumentar la calidad de planta es la fertilización. La fertilización aporta nutrientes que favorecen el desarrollo de las plantas y una mayor acumulación de reservas, lo que se traduce en un aumento de la calidad de la planta y, por tanto, de su supervivencia (Villar-Salvador et al. 2015; Grossnickle and MacDonald 2018a, b). Entre los nutrientes que se aportan en la fertilización, el nitrógeno (N) es el más importante. El N forma parte de las proteínas y los ácidos nucleicos, por lo que resulta esencial para el desarrollo del crecimiento y de los parámetros fisiológicos de las plantas (Mengel et al. 2001; Taiz and Zeiger 2010; LeBauer and Treseder 2008). Además, es un nutriente limitante en muchos ecosistemas, sobre todo en ambientes degradados (LeBauer and Treseder 2008; Delgado-Baquerizo et al. 2011). Las plantas pueden asimilar N en distintas formas químicas, tanto orgánicas (aminoácidos y proteínas) como inorgánicas

(nitrato y amonio) (Näsholm et al. 2009). Sin embargo, los compuestos de N inorgánicos presentan ciertas desventajas. El nitrato (NO_3^-) tiene un alto coste para la planta de adquisición y metabólico una vez absorbido, y una mayor disposición de ser lixiviado, ya que no queda fuertemente adsorbido en el suelo (Raven et al. 1992; Pilbeam 2011; Gruffman et al. 2013). Esto reduce su disponibilidad en suelos y su absorción, por lo que puede reducir el crecimiento de la planta, además de incrementar el riesgo de contaminación de zonas adyacentes (Raven et al. 1992). Por otro lado, el amonio (NH_4^+) estimula el crecimiento de la planta, pero a altas dosis puede generar problemas de toxicidad (Britto and Kronzucker 2002; Uscola et al. 2014) y retrasar el endurecimiento otoñal aumentando su sensibilidad a heladas (Jacobs and Landis 2009). Además, el nitrato favorece la absorción de cationes como el potasio (K^+) e inhibe la de aniones como el fósforo (P^-), mientras que el amonio produce el efecto contrario (Öhlund y Näsholm, 2001; Uscola et al., 2013). El empleo de estos fertilizantes también origina modificaciones en el sustrato, aumentando la salinidad y alterando el pH (Landis et al. 1989a; Chen 2006). Por ejemplo, mientras el nitrato basifica el sustrato, el amonio lo acidifica (Landis et al. 1989a). Por todo ello, las fuentes de N utilizadas en el fertilizante más empleadas son la mezcla de nitrato y amonio, ya que se contrarrestan los efectos negativos de cada forma química de N y se equilibra la absorción de otros nutrientes en la planta (Landis et al., 1989a; Uscola et al., 2014). Sin embargo, aunque se amortiguan las variaciones de pH, el empleo de ambas fuentes inorgánicas de N, aplicadas tanto individualmente como combinadas, siguen aumentando notablemente la salinidad en el sustrato (Landis et al., 1989).

Por otro lado, en los últimos años, se ha demostrado que las plantas pueden absorber N orgánico (Paungfoo-Lonhienne et al. 2008; Näsholm et al. 2009), y que la micorrización puede favorecer este proceso (Talbot and Treseder 2010). Sin embargo, el N orgánico apenas se está utilizando como fertilizante (Sigala 2020). La cadena carbonada de los aminoácidos supone un aporte extra de carbono (C) que las plantas pueden utilizar para sintetizar carbohidratos (Näsholm et al. 2009; Franklin et al. 2017). Usar N orgánico como fuente de N tiene como mayor ventaja su bajo coste metabólico, por lo que la energía no utilizada en metabolización podría utilizarse en una mayor tasa de crecimiento de las plantas, aumentar las reservas o incrementar la tolerancia a estrés (Gruffman et al. 2012; Franklin et al. 2017). Por otro lado, este proceso de aporte de C podría contribuir a disminuir el coste de C que la micorriza ejerce sobre la planta.

Además, los fertilizantes con N orgánico no alteran tanto el pH y la salinidad del sustrato, como ocurre con los fertilizantes de N inorgánicos, lo que también favorecería el establecimiento de la micorrización. Por todo ello, el N orgánico puede resultar una buena alternativa a los fertilizantes convencionales. Es necesario estudiar y comparar los efectos de distintas fuentes de N en la calidad de planta y el efecto que tienen sobre la micorrización.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la fertilización con dos fuentes de N, N orgánico y N inorgánico o fertilización convencional, en la calidad de planta de las especies de *Q. faginea* y *Q. ilex* y su capacidad de ser colonizadas y formar micorrizas con *T. melanosporum* y *T. aestivum*. Las hipótesis de trabajo iniciales son: (1) La fertilización con N orgánico potenciará más el crecimiento de ambas especies de quercíneas que la fertilización con fuentes de N inorgánico y (2) la fertilización con N inorgánico inhibirá la micorrización pero esta no se verá afectada por la fertilización con N orgánico. Por otro lado, (3) *T. aestivum* se verá menos afectada por la fertilización en general, y más favorecida por la fertilización con N orgánico y (4) *Q. faginea* presentará más diferencias entre fertilizantes que *Q. ilex*.

Materiales y métodos

El presente estudio desarrolló un experimento factorial completo con especies arbóreas (*Quercus faginea* y *Quercus ilex*), inóculo (sin inóculo, inoculadas con *Tuber melanosporum* e inoculadas con *Tuber aestivum*) y fertilizante según la fuente de N (sin fertilizante, fertilizante inorgánico o convencional y fertilizante orgánico). En total, se produjeron 1260 plantas, correspondientes a 70 plantas por tratamiento.

Material vegetal y esporocarpos o "trufas" de Tuber spp.

Las semillas de *Q. faginea* y *Q. ilex* se obtuvieron de *El Serranillo*, Centro de Recursos Genéticos Forestales, Guadalajara, de la región de procedencia ES10 y ES09 para *Q. faginea* y *Q. ilex*, respectivamente (Alcarria y Serranía de Cuenca, cosechadas en 2018). Las semillas fueron esterilizadas mediante lavado con lejía al 10% durante 20 minutos en los laboratorios del Departamento de Ciencias de la Vida, Unidad Docente de Ecología de la Universidad de Alcalá. Las bellotas viables se separaron por flotación en agua. En el momento de utilización, las bellotas tenían un contenido de humedad del 46 ± 2 y 35 ± 2% para *Q. faginea* y *Q. ilex*, respectivamente. A principios de febrero, se

realizó la pregerminación de las semillas en bandejas, diferenciadas por especies, a temperatura ambiente y manteniendo la humedad gracias a la envoltura en papel secante húmedo y perlita (granulometría 1-5 mm, Grupo Projar, España).

Se obtuvieron los esporocarpos o "trufas" de *T. melanosporum* y *T. aestivum*, procedentes de la Alcarria, recolectadas en enero del 2019 y verano del 2018, respectivamente. Para la validación de las trufas, se identificó la especie mediante identificación de sus esporas. Además, se comprobó la madurez de las esporas, el estado de conservación de los esporocarpos y se realizó un recuento de esporas de las distintas trufas para determinar su calidad, siendo en ambos casos superior a > $5x10^6$ esporas g^{-1}. Estas determinaciones se realizaron mediante observación al microscopio óptico a 40X, acoplado a una cámara digital (MU900, Amscope, EEUU). Para la conservación de las trufas, se laminaron, se secaron en estufa a 45ºC durante 48h y se conservaron en nevera a 4ºC hasta el momento de su utilización. Con los pesos fresco y seco de las trufas, se determinó su contenido hídrico (82 ± 2 y 78 ± 2% para *T. melanosporum* y *T. aestivum*, respectivamente).

Semillado y cultivo en vivero previo a la fertilización

La producción en vivero se llevó a cabo en el Real Jardín Botánico Juan Carlos I, Alcalá de Henares (40º30'22" N; 3º20'31" O, 600 msnm). Se utilizaron 36 bandejas forestales de plástico negro de un solo uso, cada una con 35 alveolos de 350 cm^3, previamente desinfectadas con lejía al 10%. El sustrato consistió en una mezcla 5:1 de turba rubia sin fertilizar (Kekkilä Professional, Finlandia) y piedra caliza (97.5% $CaCO_3$, granulometría de 3 mm, Tricalsa, España). La piedra caliza se añadió con el objetivo de obtener un sustrato básico, adecuado para el desarrollo de *Tuber* spp. (Chen et al. 2016). Las bandejas se colocaron en un túnel de cultivo independiente, suspendidas a 27 cm del suelo para evitar posible contaminación fúngica y un enraizamiento en el suelo del túnel, y bajo una malla de sombreo negra que transmitía el 70% de la radiación incidente.

Entre el 25 de febrero y el 18 de marzo de 2019, cuando las bellotas manifestaron la emergencia de la radícula se semillaron, aproximadamente, a una profundidad del doble del tamaño de la bellota, en las bandejas (una por alveolo, colocadas en horizontal y con la radícula hacia abajo), cubriéndose la superficie del alveolo con 1 cm de perlita (granulometría 1-5 mm, Grupo Projar, España) para

minimizar la evaporación de agua del sustrato. Se descartaron las bellotas no germinadas y los embriones gemelos. La siembra se realizó hasta completar 18 bandejas por cada especie de quercínea (630 plantas por especie). Las bandejas fueron regadas regularmente para mantener la humedad en el sustrato.

Tras el semillado, se seleccionaron 5 alveolos por bandeja de forma aleatoria, con el fin de realizar las mediciones de seguimiento en cada uno de esos individuos. Las mediciones de seguimiento se iniciaron una vez alcanzado el 90% de emergencia y consistieron en (Figura 1): (1) fecha de emergencia de cada planta; (2) metida y fase fenológica; y (3) altura y diámetro. La fenología de cada individuo se midió dos veces por semana, según la clave de Oliet et al., 2011: O, parada, brote apical en dormancia; 1, brote apical hinchado; 2, apertura del brote y primer par de hojas en expansión; 3, elongación del tallo y desarrollo de las hojas; 4, elongación del tallo terminada, maduración de las hojas y formación del nuevo brote apical. La altura y el diámetro se midieron a ras de suelo cada 15 días, empezando el 13 de junio de 2019.

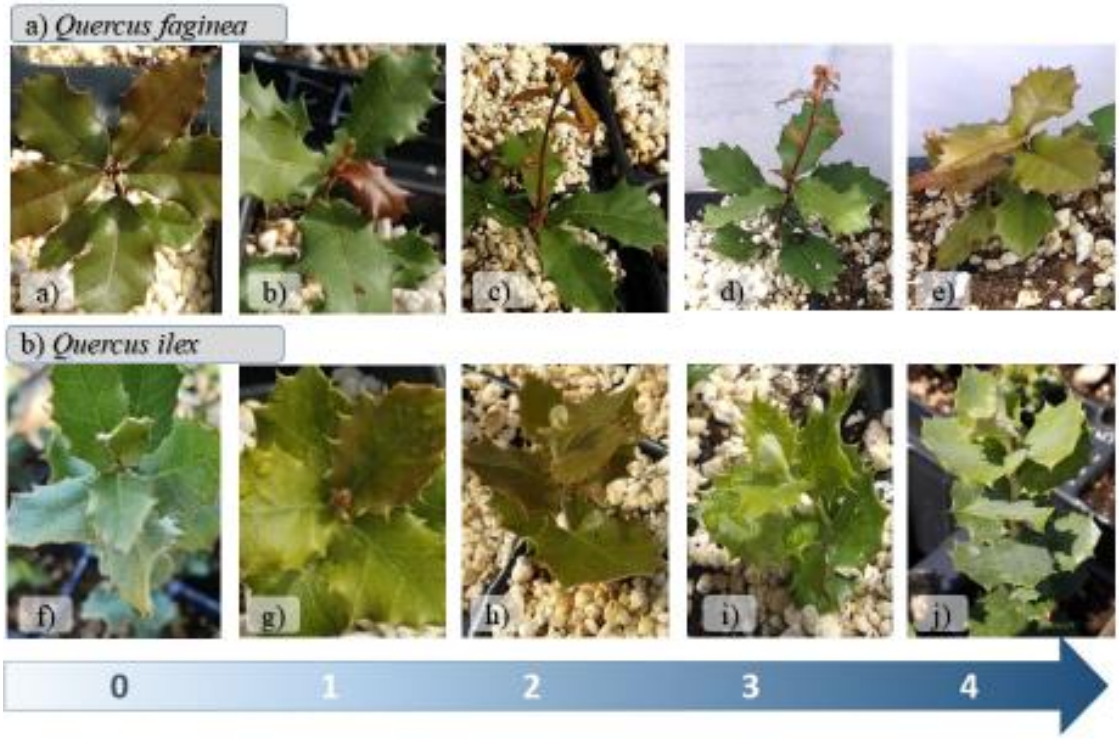


Figura 1. Fases fenológicas utilizadas en el experimento en cada metida durante el cultivo para (a) *Quercus faginea* y (b) *Q. ilex*: 0, parada, brote apical en dormancia (subfiguras a y f); 1, brote apical hinchado (subfiguras b y g); 2, apertura del brote y primer par de hojas en expansión (subfiguras c y h); elongación del tallo y desarrollo de las hojas (subfiguras d y i); 4, elongación del tallo terminada, maduración de las hojas y formación del nuevo brote apical (subfiguras e y j). Clave fenológica según la metodología de Oliet et al. 2011.

Además, durante todo el experimento, se midió la temperatura y la intensidad lumínica mediante dos sensores grabadores de datos (Pendant Temperatura/Luminosidad, Onset, Hoboware, Estados Unidos), ubicados en dos puntos distantes en la hilera de bandejas y en suspensión en el aire, a la altura de las plantas, pero permitiendo siempre una entrada de luz directa (Figura S1 en material suplementario).

Inoculación

El 8 y 10 de junio de 2019, se llevó a cabo la inoculación de *T. melanosporum* y *T. aestivum*, respectivamente. Para la preparación del inóculo de cada especie de *Tuber*, las trufas laminadas se rehidrataron con agua desionizada durante 48h, hasta alcanzar el estado hídrico inicial. Posteriormente, se trituraron hasta conseguir una solución homogénea. Dado el distinto conteo de esporas, se utilizaron distintas concentraciones para cada especie de *Tuber*, siendo de 1:10 y 1.4:10 (p:v, trufa:agua desionizada) para *T. melanosporum* y *T. aestivum*, respectivamente. El volumen de inóculo se calculó con el objetivo de añadir en cada planta 1 y 1.4 g en peso fresco de trufa para *T. melanosporum* y *T. aestivum*, respectivamente, equivalente a 5×10^6 esporas por planta. Se seleccionaron 6 bandejas al azar de cada especie de árbol para cada tipo de inóculo (210 plantas por especie de *Quercus* y tipo de inóculo). En cada alveolo se inyectaron 10 mL de la solución de inóculo, con una jeringuilla introducida bajo superficie del sustrato, en dos puntos distantes del alveolo (Figura 2).

Fertilización

El 3 de julio de 2019, dos semanas después de la inoculación, comenzaron los tratamientos de fertilización. Se eligió esta fecha, ya que el 90% de las plantas habían finalizado la segunda metida, y es a partir de este momento cuando las plantas empiezan a utilizar los recursos del suelo en lugar de los almacenados en la bellota (Villar-Salvador et al. 2010). Se utilizaron tres tratamientos de fertilización: fertilizante inorgánico o convencional, fertilizante orgánico, ambos a una concentración 10 mM de N, y sin fertilizante (control). El fertilizante convencional consistió en una mezcla de fuentes de N inorgánicas (mezcla equimolar de nitrato, NO_3^-, y amonio, NH_4^+). El fertilizante orgánico fue un fertilizante comercial (Naturamin-WSP, Daymsa, España) de origen en material vegetal liofilizado y con el N (12,8% N) en forma de N orgánico compuesto principalmente por aminoácidos (AA): serina (15%), prolina (13%), ácido

glutámico (12%), glicina (9%) y ácido aspártico (8%), leucina (8%) y otros AA (>6% de forma individual, como valina, arginina, tirosina, fenilalanina o isolucina) hasta completar un 80% de AA libres. Ambos fertilizantes fueron igualmente completados con los macronutrientes en la proporción 1:0.5:1 (N:P:K) según las recomendaciones de Landis et al., (1989). El fósforo y el potasio se añadieron en forma de K_2HPO_4, $CaHPO_4$ y K_2SO_4 (en proporción al N de 0.2, 0.3 y 0.3, respectivamente). Además, se añadieron 0.5 g L^{-1} de microelementos (Nutromix, Biagro, España). La conductividad de las soluciones de fertilizantes se midió con un conductímetro (CM35+, Crison, España) y su pH con un pH-metro (micropH2001, Crison, España), un total de cuatro veces a lo largo del experimento. Siendo el pH de 7.2 ± 0.06 y 7.5 ± 0.05, y la conductividad de 1.5 ± 0.30 y 2.2 ± 0.28 mS cm^{-1} para el fertilizante de N orgánico y N inorgánico, respectivamente.

Figura 2. Detalles de trufas y esporas (40X foto principal y 100X fotos insertadas) de distintas especies de *Tuber*: *T. melanosporum* (a y b, respectivamente) y *T. aestivum* (c y d, respectivamente); preparación del inóculo (rehidratación de láminas deshidratadas de trufas –e; trituración –f) e inoculación de *Quercus ilex* (g) y *Quercus faginea* (h).

Cada tratamiento de fertilización se aplicó a dos bandejas por especie de quercínea y tipo de inóculo (70 plantas por tratamiento), seleccionadas de forma aleatoria. Dos veces por semana, se aplicaron 45 mL de solución fertilizante a cada planta con una jeringuilla, hasta completar un total de 32 fertilizaciones. En total, se

aportaron 202 mg N planta^{-1}, cantidad correspondiente al consumo de lujo para ambas especies de *Quercus* (Villar-Salvador et al. 2013; Uscola et al. 2015). A las plantas control se les administraron 45 mL de agua, en las mismas fechas que las fertilizaciones. Además, todas las plantas se regaron con agua dos veces por semana, siempre al menos 24 h después de la fertilización, para evitar la salinización del sustrato y/o el estrés hídrico de las plantas.

Caracterización morfológica, estado de micorrización y variables fisiológicas en plantas

Cada 7-10 fertilizaciones, se realizó una cosecha de tres plantas aleatorias por bandeja (seis plantas por tratamiento), hasta completar un total de cuatro cosechas. Concretamente: el 18-07-2019, coincidiendo con el fin del periodo de crecimiento primaveral (cosecha de julio a partir de ahora); el 14-08-2019, a mediados del periodo estival (cosecha de agosto a partir de ahora); el 18-09-2019, al inicio del periodo de endurecimiento otoñal (cosecha de septiembre a partir de ahora); y el 25-10-2019, al final del periodo de crecimiento activo (cosecha de octubre a partir de ahora).

En cada cosecha se midió la concentración de clorofilas y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}) de todas las plantas cosechadas (Figura 3 a y b). Las cosechas se hicieron en días soleados sin nubosidad. La concentración en clorofilas se midió con un SPAD (SPAD-502, Minolta, Japón). La concentración de clorofilas es un indicador de la cantidad de maquinaria fotosintética que tiene la planta. El Φ_{PSII} se midió a medio día con hojas aclimatadas a luz directa con un fluorímetro de pulso modulado (FMS2, Hansatech Instruments LTD, Reino Unido). La Φ_{PSII} es un indicador de cuánta energía se transfiriere a la cadena transportadora de electrones de la maquinaria fotosintética por cada quantum de luz recibido. Ambos parámetros (clorofila y Φ_{PSII}) se midieron en las hojas maduras de la última metida completada. Posteriormente, se cosecharon las plantas y se trasladaron al laboratorio.

El mismo día de la cosecha, en el laboratorio, se extrajo manualmente y se homogeneizó el sustrato de cada planta, se separó manualmente una muestra de sustrato suficiente para ser analizada. Posteriormente, las raíces de las plantas se limpiaron mediante lavados repetidos con agua. Los sistemas radicales que mostraron estructuras radicales adecuadas, como elevado número de raíces terciarias y glomérulos de puntas de raíces, se observaron en una lupa a 10X para buscar indicios de micorrización. Si las

muestras tenían signos de posible micorrización, se conservaron en etanol al 70% para su posterior visualización al microscopio y confirmación y/o desestimación final de la micorrización. El nivel de micorrización de cada planta se evaluó y categorizó según el método de Chevalier y Grente (Andrés-Alpuente et al. 2014), que permite una evaluación confiable de todo el sistema radicular en un periodo de tiempo relativamente corto. Las categorías de micorrización siguen una escala de 0 a 5: 0, ausencia de micorrizas; 1, pocas micorrizas difíciles de encontrar; 2, colonización de micorrizas presente en solo una parte del sistema radicular, 2.5, colonización de micorrizas bien distribuidas por todo el sistema radicular con densidad suficiente o muy densa en la parte principal del sistema radicular y más baja en la parte restante; 3, colonización de micorrizas densa en todo el sistema radicular o muy densa con glomérulos en una parte y suficientemente densa en la otra; 4, colonización de micorrizas densa en todo el sistema radicular con presencia de glomérulos; 5, colonización de micorrizas muy densa en todo el sistema radicular con numerosos glomérulos en todas partes.

A continuación, las plantas fueron secadas en estufa a 60ºC durante 48h. Por último, se pesó la masa, diferenciando hojas, tallo, raíz gruesa (> 2mm) y raíz fina (< 2mm), en una balanza de precisión.

Con las muestras de sustratos se preparó una suspensión 1:5 ($v_{sustrato}$:$v_{agua\ desionizada}$) del sustrato de cultivo y agua, la suspensión se agitó durante una hora (Figura 3 c y d). Posteriormente, en las suspensiones, se midieron el pH con un pH-metro (micropH2001, Crison, España) y la conductividad eléctrica con un conductivímetro (CM35+, Crison, España) para analizar la influencia de los fertilizantes en las condiciones del sustrato (Ansorena, 1994).

Figura 3. Análisis en las cosechas: a) cuantificación de concentración de clorofilas mediante SPAD; b) medición de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}) mediante fluorímetro; c) medición de pH del extracto acuoso del sustrato; y d) medición de la conductividad eléctrica del extracto acuoso del sustrato.

Análisis estadísticos

Cada especie de quercínea se analizó de forma independiente. Para el análisis del crecimiento durante el cultivo, se utilizaron las mediciones de diámetro y altura para calcular el volumen del tallo según la ecuación:

$$\mathrm{SV} = \frac{1}{3}\,\pi\,\frac{1}{4}\,(diámetro)^2 \times \mathrm{altura} \qquad (\mathrm{cm}^3) \qquad (1)$$

Se utilizó el volumen del tallo, en lugar del diámetro y la altura, porque integra ambos parámetros y proporciona un mejor indicador del desarrollo de los tallos (Oliet et al. 2004; Sigala et al. 2020a).

Para el análisis del desarrollo fenológico, se combinó el número de metida y la fase fenológica, de manera que las decenas indican el número de metida (multiplicado por diez), y las unidades son las fases fenológicas descritas anteriormente multiplicadas por dos.

Para el análisis del volumen del tallo, y de la fenología, se ajustó un modelo logístico de tres parámetros en el que se relacionan como variables explicativas el tiempo, el fertilizante y el inóculo aplicado. El modelo logístico de 3 parámetros se ajustó según la función:

$$Respuesta = \frac{alpha}{1+e^{\left(\frac{xmid-tiempo}{scale}\right)}} \qquad (2)$$

donde: “Respuesta” es o el volumen del tallo (cm^3) o el desarrollo fenológico, “tiempo” es el tiempo en días desde la emergencia de cada planta concreta; “alpha” es la asíntota del lado derecho, o el máximo valor alcanzado de la variable respuesta; “xmid” representa el valor de tiempo en el punto de inflexión de la curva que se asemeja al momento de máxima velocidad de crecimiento de la variable estudiada; “scale” es la tasa de la variable estudiada (volumen del tallo, fase fenológica) con respecto a la variación en el tiempo en la parte lineal de la curva.

Ese modelo se aplicó a cada subconjunto de datos, considerando como subconjuntos: (a) el tratamiento de fertilizante independientemente del tratamiento de inoculación; (b) el tratamiento de inoculación independientemente del tratamiento de fertilizante; y (c) el tratamiento de fertilizante para cada inóculo específico aplicado. Tras el análisis, se eligió la aproximación en la que los parámetros del modelo fueran

significativos y además se detectaran diferencias entre los parámetros de los tratamientos. Se consideró que dos parámetros diferían estadísticamente si no existía solapamiento entre los valores del parámetro media ± error estándar.

Para el análisis del resto de atributos (masa, concentración de clorofilas, Φ_{PSII}, y pH y conductividad eléctrica del extracto del sustrato de cultivo) se ajustó un modelo lineal generalizado mixto con el paquete nlme, versión 3.1-144 (Pinheiro et. al, 2020), considerando fertilizante e inóculo como variables independientes y la bandeja como variable aleatoria.

La normalidad de los datos se comprobó con el test Shapiro y la homocedasticidad con el test Levenne, transformándose los datos cuando no cumplían la normalidad. Cuando se detectaron efectos significativos de las variables independientes, se realizó el test de comparación múltiple de medias (poshoc) Tukey (α=0.005). Todos los test estadísticos se realizaron con RStudio Desktop, versión 1.3.1093 (R Core Team, 2020).

Resultados

Evolución de las plantas durante el cultivo

Tanto para *Q. faginea* como para *Q. ilex*, los parámetros de los modelos logísticos ajustados de la evolución del volumen del tallo durante el cultivo fueron significativos en cada tratamiento de fertilización en función de la micorrización (interacción fertilizante × micorriza, Tabla 1, Figura 4).

En *Q. fagine*a, el parámetro alpha, máximo volumen del tallo alcanzado al final del periodo de crecimiento, indica que todos los tratamientos de fertilización incrementaron el volumen del tallo al final del cultivo con respecto a las no fertilizadas pero, especialmente, en las plantas fertilizadas con N inorgánico (Tabla 1, Figura 4a). Además, el tipo de inoculación modificó el volumen del tallo máximo alcanzado en cada tratamiento de fertilización (interacción fertilizante × micorriza). En general, en plantas fertilizadas, la inoculación aumentó el volumen del tallo, mientras que en no fertilizadas el patrón fue al contrario. Además, se encontró un efecto de la especie de *Tuber* utilizada que dependió de la fuente de N en el fertilizante. En N inorgánico, ambos inóculos del género *Tuber* incrementaron el volumen del tallo respecto a las no inoculadas, sin diferencias entre la especie de *Tuber*. En N orgánico, solo la inoculación

con *T. melanosporum* incrementó el volumen del tallo, la ausencia de inóculo lo redujo y cuando fueron inoculadas con *T. aestivum* presentaron un crecimiento del volumen del tallo al final del cultivo intermedio, sin diferencias estadísticas con los extremos. Por último, en plantas no fertilizadas no se encontraron diferencias entre la especie de *Tuber*, siendo el volumen del tallo siempre menor en las plantas inoculadas.

En *Q. ilex*, hubo menos diferencias de volumen del tallo máximo al final del cultivo (alpha) entre tratamientos que en *Q. faginea* (Tabla 1, Figura 4b). El máximo volumen del tallo (alpha) en *Q. ilex* se alcanzó en las plantas fertilizadas sin diferencias estadísticamente significativas entre la fuente de N e independientemente del tipo de inóculo. Por el contrario, en ausencia de fertilización, la inoculación con *Tuber* disminuyó el volumen del tallo, sobre todo cuando el inóculo fue *T. melanosporum*, mientras que con *T. aestivum* presentó crecimientos intermedios sin diferencias estadísticas con los extremos (interacción fertilizante × micorriza).

En ambas especies, dado que difirieron en el volumen del tallo alcanzado al final de cultivo (alpha) pero no en su velocidad de crecimiento (scale), el periodo de crecimiento activo (xmid) difirió entre fertilizantes e inóculos (Tabla 1, Figura 4a). En *Q. faginea*, el parámetro xmid, correspondiente a los días desde la emergencia que tarda el individuo en alcanzar el 50% de su crecimiento del volumen del tallo, indica que las plantas que más días tardaron en alcanzar este valor fueron las fertilizadas, indicando un tiempo de crecimiento más prolongado, si bien las diferencias con las no fertilizadas fueron pequeñas y muy ligadas tanto al fertilizante como al inóculo (interacción fertilizante × inóculo). En general, las que presentaron mayores tiempos de crecimiento fueron las plantas cultivadas con N inorgánico. En plantas fertilizadas, la inoculación con *T. aestivum* aumentó el tiempo de crecimiento, la no inoculación lo redujo y la inoculación con *T. melanosporum* produjo tiempos intermedios, si bien cuando las plantas fueron fertilizadas con N orgánico esta tendencia no fue significativa. En plantas no fertilizadas, el tiempo de crecimiento no difirió entre inóculos, si bien la tendencia fue a ser mayor para no inoculadas y mínimo para inoculadas con *T. aestivum*.

En *Q. ilex*, al contrario que en *Q. faginea*, aunque las plantas fertilizadas presentaron mayores tiempos de desarrollo que las no fertilizadas, no se encontraron diferencias significativas en xmid entre los tratamientos independientemente de la fuente de N utilizada o el tipo de inóculo (Tabla 1, Figura 4b). En plantas no

fertilizadas, el inóculo utilizado modificó el valor de xmid (interacción fertilizante × micorriza). Los tratamientos sin fertilizar e inoculados con ambas especies de *Tuber* fueron las que menos tardaron en alcanzar el 50% de su crecimiento. Sin embargo, las plantas no fertilizadas y sin inocular alcanzaron un crecimiento intermedio entre las no fertilizadas e inoculadas y las fertilizadas.

Las especies de quercíneas también presentaron comportamientos diferentes en la evolución de la fenología durante el cultivo en función de cada tratamiento, dependiendo tanto del fertilizante como del tipo de inóculo (interacción fertilizante × micorriza) (Tabla 2, Figura 5). En este caso, y en ambas especies de quercíneas, difirieron tanto la máxima fase fenológica alcanzada, como el momento de alcance del 50% del desarrollo fenológico y la velocidad de evolución fenológica.

Tabla 1. Parámetros de los modelos ajustados para el volumen del tallo a lo largo del periodo de cultivo, donde (i) alpha es el máximo volumen de tallo alcanzado al final del periodo de crecimiento, (ii) xmid son los días que se tarda en alcanzar el 50% del crecimiento del volumen del tallo y (iii) scale es la la velocidad de crecimiento en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM de N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio), y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Letras distintas para cada parámetro indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma especie de quercínea. Los datos son media ± error estándar (n=10).

Tratamiento		Alpha	Xmid	Scale
Fertilizante	**Inóculo**			
a) *Quercus faginea*				
N orgánico	*T. melanosporum*	0.99 ± 0.11 b	105 ± 9 b	26 ± 6 a
N orgánico	*T. aestivum*	0.82 ± 0.15 bc	124 ± 16 ab	32 ± 10 a
N orgánico	*Sin inocular*	0.56 ± 0.07 c	94 ± 10 bc	24 ± 7 a
N inorgánico	*T. melanosporum*	1.54 ± 0.33 a	123 ± 17 ab	29 ± 10 a
N inorgánico	*T. aestivum*	2.41 ± 1.18 a	178 ± 44 a	45 ± 12 a
N inorgánico	*Sin inocular*	0.81 ± 0.10 b	109 ± 10 b	23 ± 8 a
Sin fertilizar	*T. melanosporum*	0.12 ± 0.02 de	101 ± 23 bc	46 ± 16 a
Sin fertilizar	*T. aestivum*	0.10 ± 0.01 e	80 ± 8 c	33 ± 7 a
Sin fertilizar	*Sin inocular*	0.17 ± 0.05 d	101 ± 36 abc	58 ± 27 a
b) *Quercus ilex*				
N orgánico	*T. melanosporum*	1.10 ± 0.70 a	156 ± 57 a	43 ± 17 a
N orgánico	*T. aestivum*	0.79 ± 0.18 a	119 ± 18 a	31 ± 10 a
N orgánico	*Sin inocular*	0.89 ± 0.12 a	128 ± 11 a	31 ± 7 a
N inorgánico	*T. melanosporum*	0.68 ± 0.17 a	108 ± 23 a	37 ± 16 a
N inorgánico	*T. aestivum*	0.95 ± 0.42 a	164 ± 36 a	40 ± 11 a
N inorgánico	*Sin inocular*	0.89 ± 0.49 a	139 ± 58 a	47 ± 25 a
Sin fertilizar	*T. melanosporum*	0.13 ± 0.01 c	58 ± 8 b	29 ± 11 a
Sin fertilizar	*T. aestivum*	0.14 ± 0.01 bc	41 ± 12 b	30 ± 16 a
Sin fertilizar	*Sin inocular*	0.24 ± 0.09 b	92 ± 53 ab	60 ± 38 a

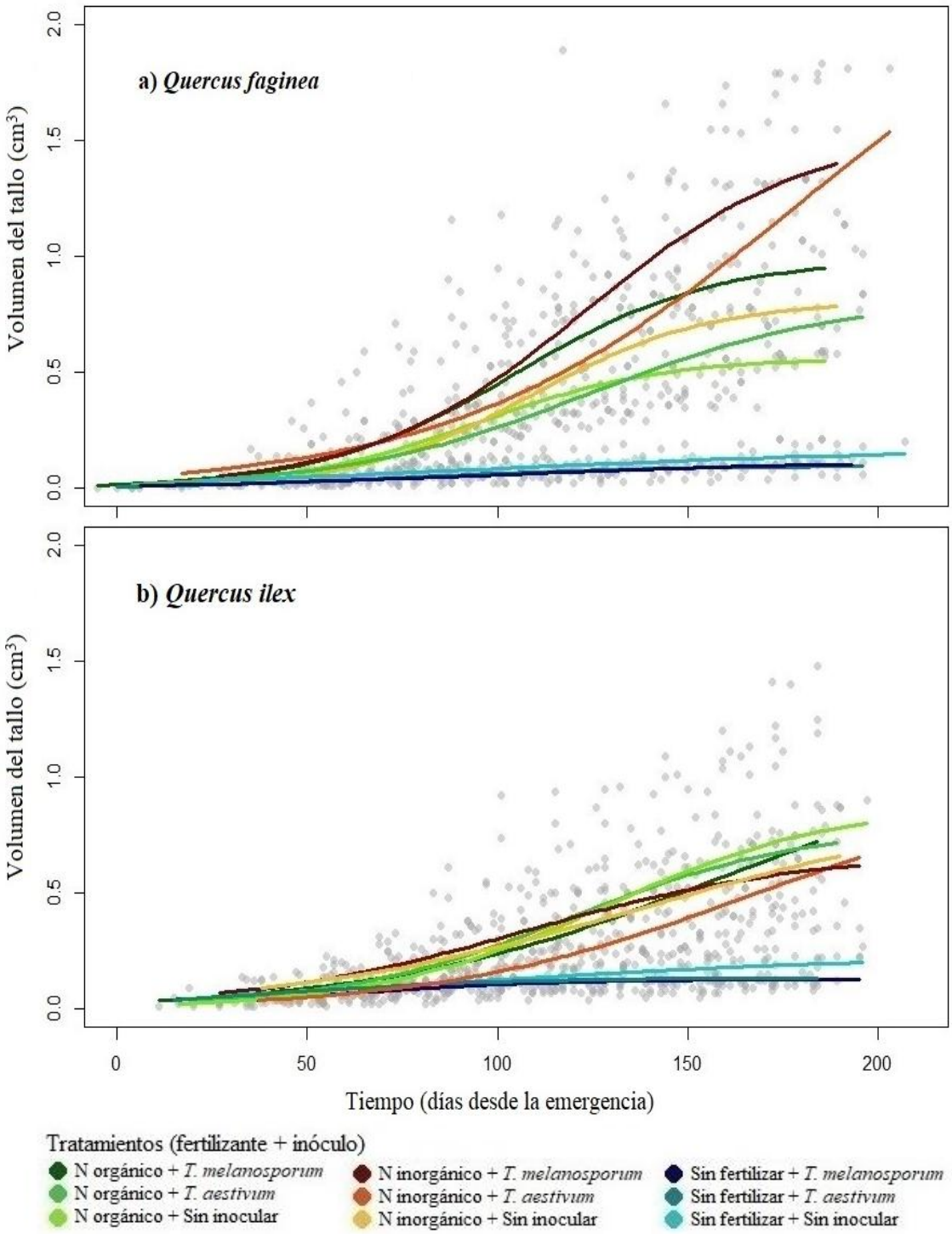


Figura 4. Evolución del volumen del tallo a lo largo del tiempo, en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM de N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio), y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Las líneas representan los modelos logísticos ajustados para cada tratamiento y los puntos son cada uno de los datos de una planta en una fecha concreta.

En *Q. faginea*, el máximo estado fenológico alcanzado en al final del cultivo, máxima metida y estado fenológico, alpha, aumentó en todas las plantas fertilizadas, llegando a superar la quinta metida, sin diferencias asociadas a la fuente de N del fertilizante o al inóculo (Tabla 2, Figura 5a). Por el contrario, las plantas que no fueron fertilizadas alcanzaron un menor desarrollo fenológico, con un máximo de tres metidas, siendo las inoculadas con *T. aestivum* las que mayor desarrollo alcanzaron, seguidas de las plantas sin fertilizar no inoculadas (interacción fertilizante × micorriza). Las no fertilizadas e inoculadas con *T. melanosporum* tuvieron los valores más bajos de desarrollo fenológico, sin llegar a finalizar la tercera metida en la última medición.

En *Q. ilex*, las plantas que mayor desarrollo fenológico alcanzaron al final del cultivo (alpha), fueron también y por lo general, las fertilizadas, alcanzando más de cuatro metidas, mientras que las plantas no fertilizadas alcanzaron como máximo la tercera metida (Tabla 2, Figura 5b). Aunque, contrariamente a *Q. faginea*, se encontraron diferencias asociadas a la fuente de N en el fertilizante y el inóculo (interacción fertilizante × micorriza). En general, las plantas fertilizadas con N orgánico, presentaron mayor desarrollo fenológico que las plantas cultivadas con N inorgánico. Además, las plantas sin inocular alcanzaron mayor número de metidas o mayor fase fenológica dentro de la misma metida que las inoculadas con *T. melanosporum*, mientras que las inoculadas con *T. aestivum* presentaron valores intermedios pero más similares a las no inoculadas. Las diferencias generadas por el inóculo dependieron del fertilizante, siendo máximas cuando las plantas fueron fertilizadas con N inorgánico y más suaves cuando fueron fertilizadas con N orgánico o no fertilizadas.

El parámetro xmid, en *Q. faginea*, indica que las plantas fertilizadas tardaron entre 30 y 50 días más que las plantas no fertilizadas en alcanzar el 50% de su desarrollo fenológico (Tabla 2, Figura 5a). El efecto del inóculo en el tiempo de desarrollo fenológico dependió del fertilizante (interacción fertilizante × micorriza). En plantas no fertilizadas y fertilizadas con N inorgánico, las plantas no inoculadas tuvieron menores valores de xmid que las inoculadas, independientemente del inóculo. Por el contrario, en las plantas fertilizadas con N orgánico, las que mayor xmid presentaron fueron las inoculadas con *T. aestivum*, seguidas de las no inoculadas, y las inoculadas con *T. melanosporum* presentaron el menor valor de xmid.

En *Q. ilex*, las plantas fertilizadas tardaron entre 20 y 40 días más en alcanzar la mitad de su desarrollo fenológico (xmid) que las no fertilizadas (Tabla 2, Figura 5b). Las plantas fertilizadas y no inoculadas presentaron valores de xmid mayores que las inoculadas, especialmente cuando el fertilizante fue N orgánico (interacción fertilizante × micorriza). Por el contrario, en plantas no fertilizadas solo la inoculación con *T. aestivum* aumentó el momento de alcance del 50% del desarrollo fenológico y los valores mínimos se alcanzaron en plantas sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*.

En *Q. faginea*, la velocidad de desarrollo fenológico (scale) fue mínima en las plantas no fertilizadas, independientemente del inóculo. De entre las fertilizadas, la mayor velocidad de desarrollo fenológico fue en las plantas cultivadas con N inorgánico e inoculadas con *T. aestivum*, intermedia en el resto de tratamientos de N inorgánico y menor en las plantas fertilizadas con N orgánico (Tabla 2, Figura 5a).

Tabla 2. Parámetros de los modelos ajustados para el estado fenológico a lo largo del periodo de cultivo, donde (i) alpha es el máximo desarrollo fenológico, alcanzado al final del periodo de crecimiento, medido como metida y estado fenológico, (ii) xmid son los días que tarda en alcanzar el 50% del desarrollo fenológico y (iii) scale es la velocidad de desarrollo fenológico en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio), y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Letras distintas para cada parámetro indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma especie de quercínea. Los datos son media ± error estándar (n=10).

Tratamiento		Alpha	Xmid	Scale
Fertilizante	**Inóculo**			
a) *Quercus faginea*				
N orgánico	*T. melanosporum*	51.38 ± 1,06 a	43 ± 2 c	39 ± 3 b
N orgánico	*T. aestivum*	51.98 ± 1,05 a	60 ± 2 a	38 ± 3 b
N orgánico	*Sin inocular*	51.05 ± 0.86 a	49 ± 2 b	38 ± 2 b
N inorgánico	*T. melanosporum*	52.55 ± 1,00 a	49 ± 2 b	42 ± 3 ab
N inorgánico	*T. aestivum*	51.20 ± 1,22 a	45 ± 3 bc	53 ± 4 a
N inorgánico	*Sin inocular*	52.29 ± 1,62 a	40 ± 3 c	46 ± 6 ab
Sin fertilizar	*T. melanosporum*	28.63 ± 0.35 d	9 ± 3 d	24 ± 3 c
Sin fertilizar	*T. aestivum*	32.23 ± 0.32 b	14 ± 2 d	25 ± 2 c
Sin fertilizar	*Sin inocular*	31.16 ± 0.21 c	7 ± 2 e	27 ± 2 c
b) *Quercus ilex*				
N orgánico	*T. melanosporum*	50.91 ± 1.32 b	44 ± 2 c	44 ± 3 b
N orgánico	*T. aestivum*	54.04 ± 1.05 a	41 ± 2 c	50 ± 3 ab
N orgánico	*Sin inocular*	56.23 ± 1.37 a	57 ± 2 b	46 ± 3 b
N inorgánico	*T. melanosporum*	45.17 ± 0.69 d	44 ± 1 c	31 ± 2 c
N inorgánico	*T. aestivum*	46.85 ± 0.90 c	46 ± 1 c	39 ± 3 b
N inorgánico	*Sin inocular*	56.37 ± 1.69 a	64 ± 3 a	55 ± 4 a
Sin fertilizar	*T. melanosporum*	28.57 ± 0.58 f	2 ± 8 e	36 ± 7 bc
Sin fertilizar	*T. aestivum*	31.61 ± 0.68 e	18 ± 3 d	29 ± 4 c
Sin fertilizar	*Sin inocular*	32.01 ± 0.33 e	10 ± 3 e	26 ± 3 c

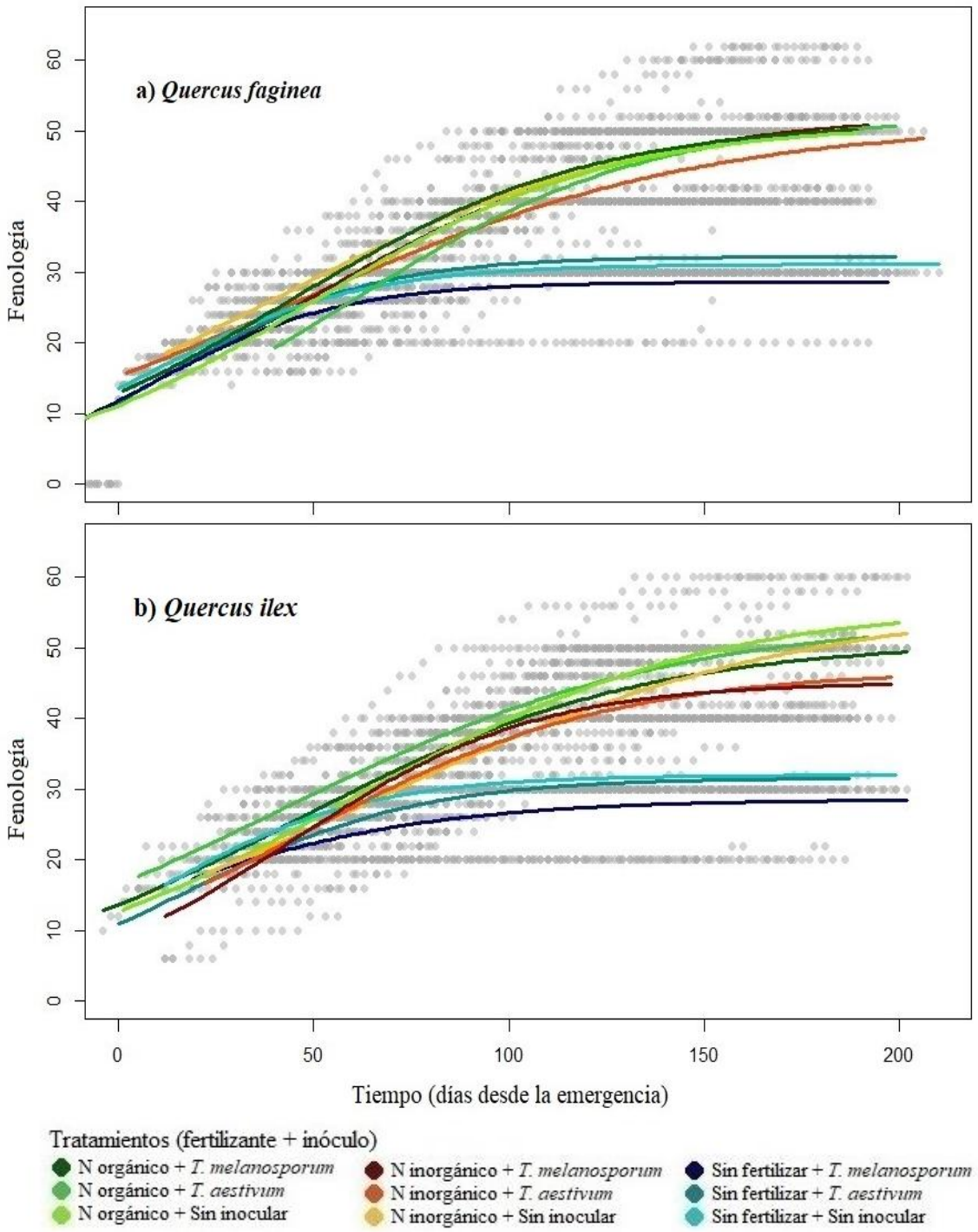


Figura 5. Evolución del estado fenológico a lo largo del tiempo, en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* (b) sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Las líneas representan los modelos logísticos ajustados para cada tratamiento y los puntos son cada uno de los datos de una planta en una fecha concreta. Nota: en los valores de fenología, las decenas indican el número de metida y las unidades la fase fenológica de la planta, con valores de 0 (brote terminal formado y sin signos de crecimiento activo), 2 (brote terminal engrosado), 4 (desarrollo inicial de las hojas), 6 (hojas y tallo en expansión apical) y 8 (hojas en fase de maduración y tallo elongado en su totalidad).

En *Q. ilex*, la mayor velocidad de crecimiento (scale) se obtuvo en las plantas fertilizadas, y la menor en las no fertilizadas. Sin embargo, en plantas fertilizadas con N inorgánico, el inóculo modificó la velocidad de crecimiento, siendo mayor en las no inoculadas y mínimo en las inoculadas con *T. melanosporum* (interacción fertilizante × micorriza, Tabla 2, Figura 5).

Desarrollo y micorrización de las plantas al final del cultivo

Las diferencias entre tratamientos, tanto en la masa de planta como en los distintos órganos y en los parámetros fisiológicos (concentración en clorofilas y Φ_{PSII}), no aparecieron hasta la segunda cosecha, mostrando solo diferencias entre plantas fertilizadas y no fertilizadas (datos no mostrados). Por simplicidad, únicamente se muestran los datos de la última cosecha, donde las diferencias entre tratamientos fueron máximas.

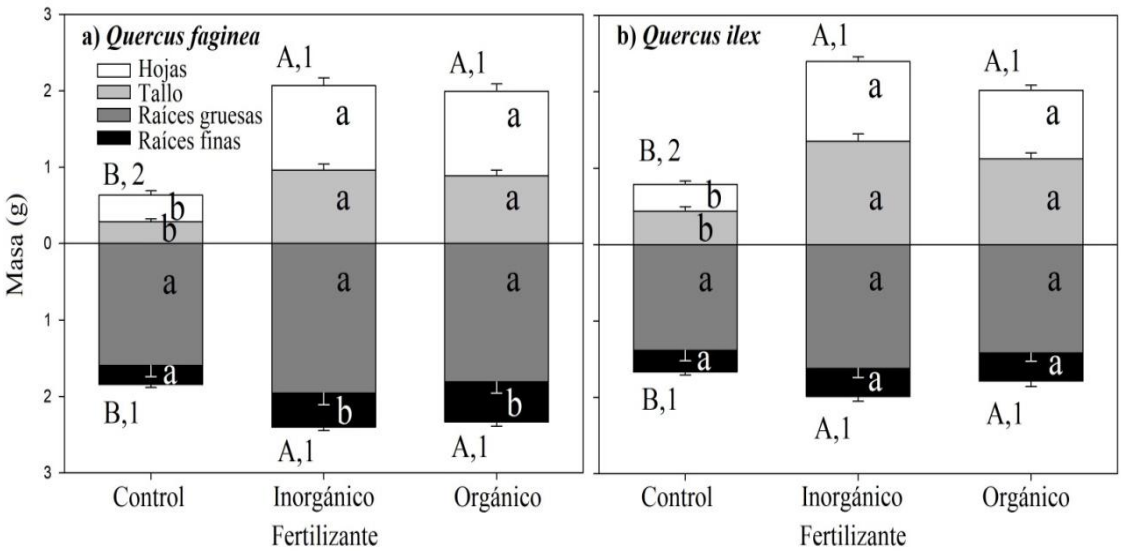


Figura 6. Masa en la última cosecha (octubre) de los distintos órganos, parte aérea (hojas y tallo), parte radical (raíces gruesas y raíces finas), y de la planta completa y ratio parte aérea/parte radical (PA/PR) en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre los órganos. Distintas números en la parte superior (o inferior) indican diferencias significativas entre la parte aérea (o la parte radical). Distintas letras mayúsculas en la parte superior (o inferior) indican diferencias entre la planta completa (o el ratio PA/PR) (Tukey HSD, α=0.05). Los datos son media ± error (n=18).

La inoculación no afectó la masa en ninguna de las dos especies de quercíneas, ni la masa de los órganos ni la masa total de la planta (Tabla 3, Figura 6). Aunque no hubo diferencias entre los tratamientos de fertilización, la fertilización incrementó la masa de todos los órganos respecto a las plantas no fertilizadas, a excepción de la masa de raíces gruesas en *Q. faginea*, y la masa de raíces tanto gruesas como finas *en Q. ilex*, que no presentaron diferencias con las no fertilizadas. Consecuentemente, la masa de la parte aérea y de la planta completa también aumentó en las plantas fertilizadas respecto a las no fertilizadas en ambas especies. Aunque la fertilización aumentó la masa de raíces finas en *Q. faginea*, el efecto no fue suficiente para que se detectasen diferencias significativas a nivel de la parte radical. Tampoco se encontraron diferencias en la parte radical de *Q. ilex* entre plantas fertilizadas y plantas sin fertilizar. Sin embargo, dado el aumento de masa de la parte aérea, el ratio parte aérea/parte radical (PA/PR) fue mayor en plantas fertilizadas de ambas especies de quercíneas que en plantas no fertilizadas.

Tabla 3. Valores de F y p de masa en la última cosecha (octubre) de los distintos órganos, parte aérea (hojas y tallo), parte radical (raíces gruesas y raíces finas), planta completa y ratio parte aérea/parte radical (PA/PR) en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente.

	Micorriza	**Fertilizante**	**Fertilizante × Micorriza**
a) *Quercus faginea*			
Hojas	$F_{2,54}$ = 0.88; p = 0.42	**$F_{2,54}$ = 41.31; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.51; p = 0.73
Tallo	$F_{2,54}$ = 1.64; p = 0.25	**$F_{2,54}$ = 32.60; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.45; p = 0.77
Raíces gruesas	$F_{2,54}$ = 1.18; p = 0.32	$F_{2,54}$ = 1.38; p = 0.26	$F_{4,54}$ = 0.21; p = 0.93
Raíces finas	$F_{2,54}$ = 0.72; p = 0.49	**$F_{2,54}$ = 8.44; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.37; p = 0.83
Parte aérea	$F_{2,54}$ = 1.39; p = 0.26	**$F_{2,54}$ = 44.24; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.47; p = 0.76
Parte radical	$F_{2,54}$ = 1.26; p = 0.29	$F_{2,54}$ = 2.81; p = 0.07	$F_{4,54}$ = 0.06; p = 0.99
Planta	$F_{2,54}$ = 1.54; p = 0.23	**$F_{2,54}$ = 14.05; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.08; p = 0.99
Ratio PA/PR	$F_{2,54}$ = 0.05; p = 0.95	**$F_{2,54}$ = 37.83; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.56; p = 0.70
b) *Quercus ilex*			
Hojas	$F_{2,54}$ = 1.72; p = 0.19	**$F_{2,54}$ = 46.29; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.45; p = 0.24
Tallo	$F_{2,54}$ = 2.11; p = 0.13	**$F_{2,54}$ = 54.10; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.48; p = 0.22
Raíces gruesas	$F_{2,54}$ = 2.53; p = 0.09	$F_{2,54}$ = 1.24; p = 0.30	$F_{4,54}$ = 1.62; p = 0.19
Raíces finas	$F_{2,54}$ = 0.94; p = 0.43	$F_{2,54}$ = 1.03; p = 0.40	$F_{4,54}$ = 2.16; p = 0.16
Parte aérea	$F_{2,54}$ = 2.04; p = 0.14	**$F_{2,54}$ = 53.96; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.57; p = 0.20
Parte radical	$F_{2,54}$ = 2.11; p = 0.13	$F_{2,54}$ = 1.26; p = 0.29	$F_{4,54}$ = 1.88; p = 0.13
Planta	$F_{2,54}$ = 2.43; p = 0.10	**$F_{2,54}$ 16.19= ; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 2.00; p = 0.11
Ratio PA/PR	$F_{2,54}$ = 1.12; p = 0.34	**$F_{2,54}$ = 80.75; p < 0.001**	$F_{4,54}$ 0.28= ; p = 0.89

En *Q. faginea* la concentración de clorofilas, indicador de la magnitud de la maquinaria fotosintética, solo dependió del fertilizante, siendo mayor en las plantas fertilizadas que en las no fertilizadas, pero independientemente del fertilizante específico (Tabla 4, Figura 7). En cambio, en *Q. ilex*, la concentración de clorofilas dependió tanto del fertilizante como del inóculo (interacción fertilizante × micorriza), siendo máximo en las plantas fertilizadas con N inorgánico e inoculadas con *T. melanosporum*, seguido de plantas no inoculadas fertilizadas con N orgánico, mínimo en las no fertilizadas e inoculadas con *T. melanosporum*, e intermedia en el resto de tratamientos.

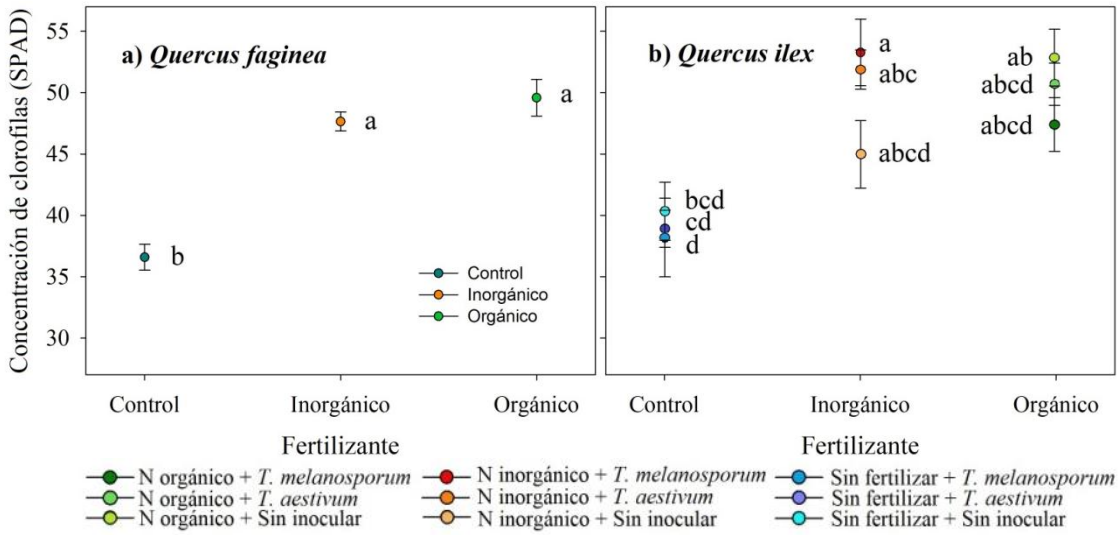


Figura 7. Concentración de clorofilas en las hojas en la última cosecha (octubre) en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* (b) sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tratamientos (Tukey HSD, α=0.05). Los datos son media ± error (n=18 o 6 para *Q. faginea* y *Q. ilex*, respectivamente).

En ambas quercíneas, la eficiencia real del fotosistema II (Φ_{PSII}) en las hojas, que indica la eficiencia real a la que la energía lumínica es transferida a la maquinaria fotosintética a través de la cadena de transporte de electrones, aumentó en las plantas fertilizadas con respecto a las no fertilizadas, independientemente del fertilizante específico y del tipo de inoculación aplicada (Tabla 4, Figura 8).

Al final del cultivo, únicamente se observaron puntas micorrizadas aisladas (categorías 0 y 1) de ambas especies de *Tuber* en ambas especies de quercíneas. No se encontraron evidencias de hongos espontáneos o contaminantes.

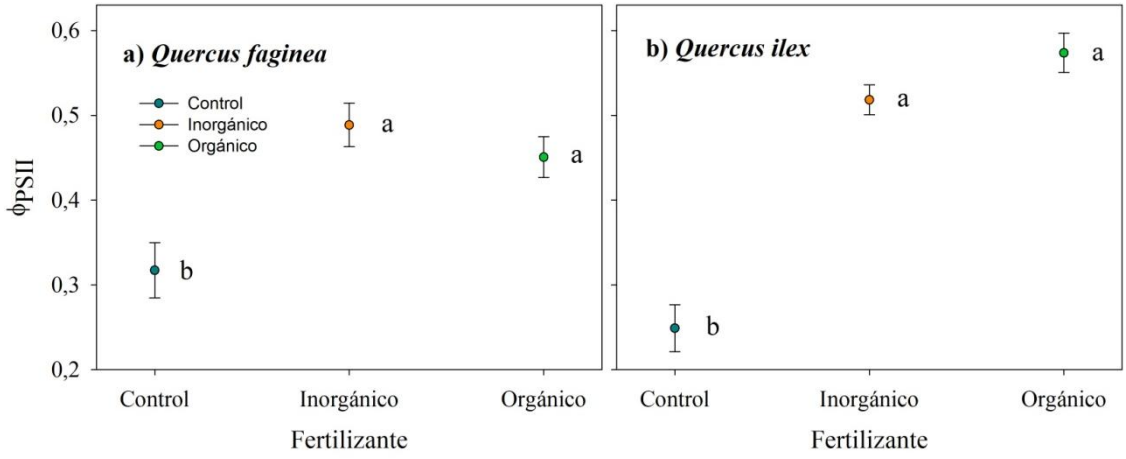


Figura 8. Eficiencia real del fotosistema II (Φ_{PSII}) en las hojas en la última cosecha (octubre) en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* (b) sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Diferentes letras indican diferencias significativas entre distintos tratamientos (Tukey HSD, α=0.05). Los datos son media ± error estándar (n=18).

Tabla 4. Valores de F y p de las mediciones de concentración en clorofilas y eficiencia real del fotosistema II (Φ_{PSII}) en la última cosecha (octubre), en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente.

	Micorriza	**Fertilizante**	**Fertilizante × Micorriza**
a) *Quercus faginea*			
Clorofilas	$F_{2,54}$ = 1.73; p = 0.23	**$F_{2,54}$ = 29.32; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.37; p = 0.82
Φ_{PSII}	$F_{2,54}$ = 0.31; p = 0.74	**$F_{2,54}$ = 8.74; p = 0.007**	$F_{4,54}$ = 0.88; p = 0.51
b) *Quercus ilex*			
Clorofilas	$F_{2,54}$ = 0.11; p = 0.89	**$F_{2,54}$ = 22.19; p < 0.001**	**$F_{4,54}$ = 2.67; p = 0.04**
Φ_{PSII}	$F_{2,54}$ = 0.94; p = 0.42 b	**$F_{2,54}$ = 36.44; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.05; p = 0.44

Características químicas en el extracto acuoso del sustrato a lo largo del cultivo

En ambas quercíneas, tanto el pH como la conductividad eléctrica del extracto acuoso del sustrato, difirieron entre fertilizantes a lo largo de todo el experimento, pero sin efecto del inóculo. El pH se redujo con el tiempo en todos los tratamientos. En general, el fertilizante, independientemente del fertilizante específico, disminuyó el pH en ambas especies (Tabla 5, Figura 9). Si bien en *Q. faginea* las diferencias fueron constantes a lo largo del tiempo, en *Q. ilex* las diferencias de pH entre sustratos fertilizados y no fertilizados aumentaron con el tiempo.

En general, y en ambas especies, la aplicación de fertilizantes también aumentó la conductividad del sustrato con respecto a las no fertilizadas, y el inóculo no modificó la conductividad (Tabla 5, Figura 10). Además la conductividad del sustrato de las plantas fertilizadas se incrementó con el tiempo, mientras que se mantuvo constante en los sustratos no fertilizados. En general, la conductividad no difirió entre tratamientos de fertilización. Si bien este patrón es constante para *Q. ilex*, en *Q. faginea*, la fertilización con N orgánico indujo una menor conductividad que la fertilización con N inorgánico, pero solo en la fecha de agosto.

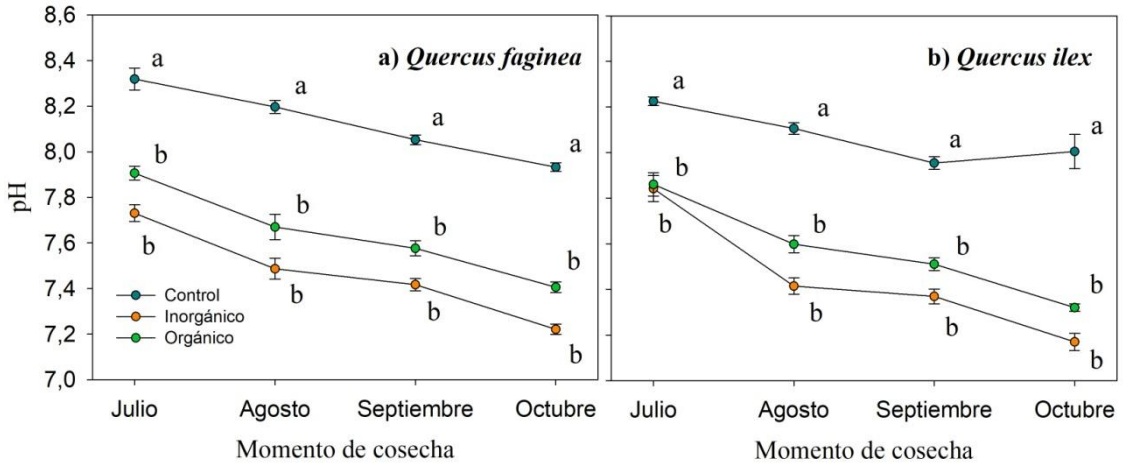


Figura 9. Valores de pH en el extracto acuoso del sustrato de cultivo (5:1 V:V), en cada una de las cosechas (julio, agosto, septiembre, octubre), en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Diferentes letras indican diferencias significativas dentro del mismo momento de cosecha entre distintos tratamientos de fertilizante (Tukey HSD, α=0.05). Los datos son media ± error estándar (n=18).

Tabla 5. Valores de F y p de las mediciones de pH y conductividad eléctrica en el extracto acuoso del sustrato de cultivo (5:1 V:V), en cada una de las cosechas (julio, agosto, septiembre, octubre), en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente.

	Micorriza	**Fertilizante**	**Fertilizante × Micorriza**
a) *Quercus faginea*			
pH			
Cosecha Julio	$F_{2,54}$ = 3.04; p = 0.10	**$F_{2,54}$ = 46.04; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.26; p = 0.90
Cosecha Agosto	$F_{2,54}$ = 0.07; p = 0.93	**$F_{2,54}$ = 63.87; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 2.81; p = 0.09
Cosecha Septiembre	$F_{2,54}$ = 0.48; p = 0.64	**$F_{2,54}$ = 64.63; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.48; p = 0.75
Cosecha Octubre	$F_{2,54}$ = 1.32; p = 0.32	**$F_{2,54}$ = 260.22; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.74; p = 0.23
Conductividad			
Cosecha Julio	$F_{2,54}$ = 0.25; p = 0.79	**$F_{2,54}$ 31.09= ; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.14; p = 0.96
Cosecha Agosto	$F_{2,54}$ = 0.19; p = 0.83	**$F_{2,54}$ = 434.48; p < 0.001**	$F_{4,54}$ 1.25= ; p = 0.30
Cosecha Septiembre	$F_{2,54}$ = 0.79; p = 0.49	**$F_{2,54}$ = 171.11; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.33; p = 0.85
Cosecha Octubre	$F_{2,54}$ = 0.91; p = 0.44	**$F_{2,54}$ = 196.05; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.39; p = 0.82
b) *Quercus ilex*			
pH			
Cosecha Julio	$F_{2,54}$ = 0.32; p = 0.74	**$F_{2,54}$ = 12.04; p = 0.0028**	$F_{4,54}$ = 1.15; p = 0.40
Cosecha Agosto	$F_{2,54}$ = 0.67; p = 0.54	**$F_{2,54}$ = 98.43; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.53; p = 0.72
Cosecha Septiembre	$F_{2,54}$ = 1.52; p = 0.27	**$F_{2,54}$ = 99.56; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 2.90; p = 0.09
Cosecha Octubre	$F_{2,54}$ = 0.49; p = 0.63	**$F_{2,54}$ = 39.10; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.49; p = 0.74
Conductividad			
Cosecha Julio	$F_{2,54}$ = 1.50; p = 0.28	**$F_{2,54}$ = 124.84; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.63; p = 0.66
Cosecha Agosto	$F_{2,54}$ = 1.08; p = 0.35	**$F_{2,54}$ = 182.76; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.08; p = 0.38
Cosecha Septiembre	$F_{2,54}$ = 0.78; p = 0.46	**$F_{2,54}$ = 450.74; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 1.97; p = 0.12
Cosecha Octubre	$F_{2,54}$ = 0.12; p = 0.89	**$F_{2,54}$ = 463.38; p < 0.001**	$F_{4,54}$ = 0.96; p = 0.48

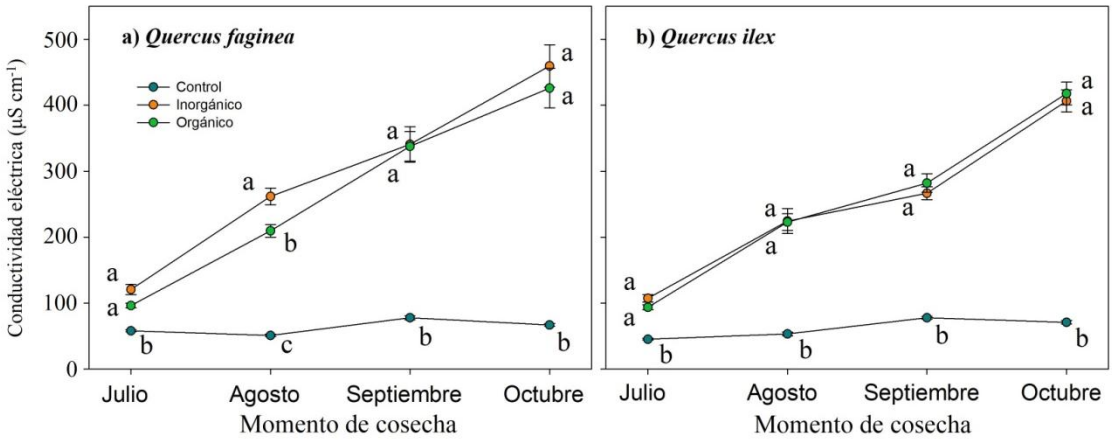


Figura 10. Valores de conductividad eléctrica en el extracto acuoso del sustrato de cultivo (5:1 V:V) en cada una de las cosechas (julio, agosto, septiembre, octubre), en plantas de (a) *Quercus faginea* y (b) *Quercus ilex* sin fertilizar o fertilizadas a 10 mM N a un total de 202 mg N planta^{-1} con N orgánico o con N inorgánico (mezcla equimolar de nitrato y amonio) y sin inocular o inoculadas con *T. melanosporum*, o con *T. aestivum*, durante el primer año de cultivo. Las especies de quercíneas se analizaron de forma independiente. Diferentes letras indican diferencias significativas dentro del mismo momento de cosecha entre distintos tratamientos de fertilizante (Tukey HSD, α=0.05). Los datos son media ± error estándar (n=18).

Discusión

Efectos de la fertilización y de las fuentes de N en la calidad de planta

En ambas especies de quercíneas, el fertilizante con N orgánico promovió el crecimiento al mismo nivel que el fertilizante con N inorgánico. Las plantas también fueron muy similares entre fertilizantes en otros atributos fisiológicos, como la concentración de clorofilas o la eficiencia real del fotosistema II. Esto demuestra que, además de crecer en la misma magnitud, las plantas presentaron la misma capacidad fisiológica con ambos fertilizantes. En muchas especies, los beneficios de la fertilización con N orgánico en crecimiento y atributos fisiológicos de las platas es también modesto, siendo la respuesta de plantas fertilizadas con fuentes de N orgánicas e inorgánicas muy similar, por ejemplo en *Pinus engelmannii* (Sigala et al. 2020a) o en *Pinus ponderosa* (Sigala, et al., 2020). A pesar de la ausencia de diferencias iniciales, en otros estudios sí que se han encontrado moderados beneficios una vez las plantas son sometidas a estrés, teniendo las plantas fertilizadas con N orgánico una mayor velocidad de aclimatación a factores de estrés como la sequía (Sigala et al. 2020b) o las heladas (Sigala and Oliet 2020). Por ello, los beneficios del N orgánico podrían resultar en una mayor capacidad de tolerar factores de estrés más que en las características iniciales de calidad de planta. Por otro lado, los fertilizantes inorgánicos pueden contaminar el suelo y los flujos de agua adyacentes (Raven et al. 1992; Galloway et al. 2003), por lo que el N orgánico reduciría el impacto ambiental de los fertilizantes convencionales (Khamwichit et al. 2006). Por último, el uso de fertilizantes de N orgánicos es susceptible a recibir subvenciones y sellos de producción ecológica, lo que beneficiaría a los viveros forestales reduciendo sus costes o aumentando su valoración pública (Brady 2003; Sun et al. 2012; Unión Europea 2018; Wang et al. 2018). Por tanto, el N orgánico podría ser una alternativa viable en los programas de fertilización de producción de las especies *Q. faginea* y *Q. ilex*.

La ausencia de diferencias entre plantas fertilizadas con distintas fuentes de N en este estudio puede deberse a que el fertilizante convencional con N inorgánico empleado fue una mezcla equimolar de nitrato y amonio. El empleo de NO_3^- y NH_4^+ en conjunto puede suavizar los efectos negativos que tendrían ambas fuentes de N por separado (Uscola et al., 2014; Franklin et al., 2017; Sigala et al., 2020), reduciendo los efectos morfofisiológicos asociados a una fuente de N concreta e igualando las características entre plantas. Por otro lado, este experimento se realizó con cantidades de

N (202 mg N planta^{-1}) dentro del consumo de lujo, tanto para *Q. faginea*, con un nivel de suficiencia de 150 mg de N planta^{-1} (Villar-Salvador et al. 2013) como para *Q. ilex*, con un nivel de suficiencia de 200 mg de N planta^{-1} (Uscola et al. 2015). Una vez superado el nivel de suficiencia, las plantas no invierten el extra de recursos en crecimiento (Timmer and Armstrong 1987; Timmer and Aidelbaum 1996), lo que reduciría las diferencias morfológicas entre plantas fertilizadas con distintas fuentes de N. De la misma forma, a partir de cierto umbral elevado de N, la concentración de clorofilas y la eficiencia de la fotosíntesis tampoco se ve favorecida (Warren et al. 2000; Warren and Adams 2004). En condiciones de consumo de lujo, el atributo que más podría diferir entre fuentes de N sería el estado nutricional o las reservas (Timmer and Armstrong 1987; Timmer and Aidelbaum 1996). Los resultados de los análisis nutricionales de estas plantas podrán determinar si este aspecto se ve modificado por las fuentes de N.

Ambas especies de quercíneas no respondieron igual a los distintos fertilizantes, aunque estas diferencias fueron muy moderadas, con *Q. faginea* mostrando más diferencias en respuesta a las fuentes de N que *Q. ilex*. *Quercus faginea* presentó diferencias en respuesta a las fuentes de N más marcadas que *Q. ilex* en el crecimiento del volumen del tallo y en el desarrollo fenológico, maximizándose en las plantas fertilizadas con N inorgánico. Por el contrario, en *Q. ilex* apenas se encontraron diferencias entre las distintas fuentes de N y, si bien ciertos parámetros durante el cultivo se maximizaron con N orgánico. Aun así, estas diferencias fueron tan leves que no se reflejaron en la masa al final del cultivo. Otros estudios han encontrado diferencias morfofisiológicas asociadas a la fuente de N aplicada como en *Picea abies L.* y *Pinus sylvestris L.* (Gruffman et al. 2012; Franklin et al. 2017), *Populus tremula* (Franklin et al. 2017), o en *Pinus greggii* (Sigala 2020), donde las plantas fertilizadas con N orgánico aumentaron significativamente su masa, y en especial la masa de raíces finas. La plasticidad ante las fuentes de N es especie dependiente, siendo, por norma general, mucho más plásticas las especies de crecimiento rápido (Uscola et al. 2014; Sigala et al. 2020a, b). *Quercus faginea* es una especie más plástica a la disponibilidad de nutrientes en el suelo y de crecimiento más rápido que *Q. ilex* (Villar-salvador et al. 2014). En cambio, *Q. ilex*, tiene menor tasa de crecimiento y muy poca plasticidad en respuesta a la fertilización y, en concreto, muy poca plasticidad a las fuentes de N

(Villar-Salvador et al. 2014). Estas diferencias entre especies de quercíneas explicarían su distinta respuesta a las fuentes de N.

En cualquier caso, la fertilización favoreció la calidad de planta notablemente respecto a las no fertilizadas. Concretamente, la fertilización aumentó el crecimiento del volumen del tallo, el crecimiento de la parte aérea y el crecimiento de las raíces, especialmente de las raíces finas en *Q. faginea*. El tamaño de las plantas tiene especial relevancia en su supervivencia en el campo (Villar-Salvador et al., 2012; Grossnickle, 2018). Plantas más grandes tienen mayor capacidad de adquirir recursos, fijar C a través de las hojas o adquirir nutrientes del suelo por las raíces, lo que les confiere mejores habilidades competitivas y mayor capacidad de establecimiento una vez plantadas en campo (Villar-Salvador et al. 2012, 2015). A pesar del incremento de las raíces, éste no fue suficiente para aumentar significativamente la parte radical, por lo que se observó un mayor ratio PA/PR en plantas fertilizadas. Este aumento de ratio PA/PR es un efecto muy conocido de la fertilización, sin que por ello se reduzca la calidad de planta (Villar-Salvador et al. 2012, 2015; Grossnickle 2018; Grossnickle and MacDonald 2018a). La fertilización no solo incrementó el crecimiento sino que también maximizó atributos fisiológicos relacionados con la capacidad fotosintética. La fertilización aumentó la concentración de clorofilas. Aumentos en la cantidad de maquinaria fotosintética como clorofilas se traducen en una mayor capacidad fotosintética (Warren et al. 2000; Warren and Adams 2004). Consistentemente, las plantas fertilizadas presentaron también mayor Φ_{PSII}. Todo ello sugiere que las plantas fertilizadas tienen mayor capacidad fotosintética. Por último, la fertilización aumenta las reservas en planta (Villar-Salvador et al., 2012; Grossnickle, 2018), lo que aumenta el éxito y el establecimiento en el campo (del Campo et al. 2009; Grossnickle and MacDonald 2018a). Por todo ello, la fertilización es clave para aumentar la calidad de planta producida en vivero.

Efectos de la micorrización con T. melanosporum y T. aestivum

No se encontraron resultados visibles de micorrización de calidad en ninguna de las plantas, tanto fertilizadas como sin fertilizar. Por ello, no puede afirmarse que el fertilizante, o un fertilizante en concreto, favoreciera el establecimiento de la simbiosis, al igual que no pueden analizarse las diferencias en la respuesta de las especies de *Tuber* a los fertilizantes. La ausencia de micorrización podría indicar un efecto inhibitorio por el fertilizante. Uno de los efectos más conocidos de la fertilización es que altera las condiciones del sustrato, como el pH y la salinidad (Landis D. 1989). En este

experimento, los valores de pH en el extracto acuoso del sustrato de cultivo en *Q. faginea* variaron entre 7.9-7.4 y 7.7-7.2 para fertilizantes con N orgánico y con N inorgánico, respectivamente, y en *Q. ilex* entre 7.9-7.4 y 7.9-7.2 para fertilizantes con N orgánico y con N inorgánico, respectivamente. Estos valores de pH están dentro de los rangos de tolerancia para ambas especies de *Tuber*. De hecho, el pH medio de los suelos de *T. melanosporum* oscila entre 7.5 y 8.3, y para *T. aestivum* el rango es todavía más amplio, entre 5.9 y 8.4 (García-Montero et al., 2007d; Colinas et al., 2007; Jaillard et al., 2014). Así, el valor de pH en el sustrato está dentro de los rangos óptimos para *T. aestivum* en ambas quercíneas y con ambos fertilizantes. Sin embargo, en el caso de *T. melanosporum* el rango de pH obtenido en sustratos fertilizados con N inorgánico está en el margen inferior de tolerancia, por lo que la fertilización con N inorgánico podrían reducir la capacidad colonizadora en esta especie. Respecto a la conductividad eléctrica, no se han encontrado datos concretos para rangos óptimos en estas especies, aunque otros estudios afirman que el aumento de la salinidad perjudica el desarrollo micorrícico en el género *Tuber* (Nadim et al. 2016). Si bien las diferencias en la salinidad del sustrato entre fertilizantes no fueron significativas, la conductividad de los sustratos fertilizados con N orgánico fue ligeramente inferior. Por todo ello, consideramos que el efecto inhibitorio del fertilizante no puede achacarse a la modificación de las condiciones del sustrato, siendo los reducidos efectos negativos mucho menores en el fertilizante basado en N orgánico, que en ningún caso limitaría el desarrollo de las especies de *Tuber*.

Por otro lado, hay múltiples resultados que sugieren que la ausencia de micorrización en el experimento se debe a que no ha dado tiempo al completo desarrollo de la colonización micorrícica. En primer lugar, no se encontró una micorrización evidente, pero sí se encontraron puntas micorrrizadas por *Tuber* spp. de forma aislada en las raíces terciarias de algunos individuos (datos no mostrados), lo que sugiere que el proceso de micorrización es incipiente. En segundo lugar, en las plantas de ambas especies de quercínea se detectaron efectos significativos del inóculo en algunos parámetros, como en el crecimiento del volumen del tallo y en la evolución de la fenología en ambas especies, y en un aumento en la concentración de clorofilas en *Q. ilex*. Estos resultados evidencian que existe un efecto del inóculo en ambas especies, si bien la micorriza en sí no es evidenciable. Por otro lado, las plantas no fertilizadas de ambas especies tampoco presentaron resultados visibles de micorrización, lo que indica

un efecto común entre las plantas fertilizadas y las no fertilizadas y sugiere que, si no hay micorrización, no se debe a un efecto inhibidor de la fertilización. Además, tampoco se encontraron hongos espontáneos o contaminantes, lo que corrobora que la ausencia de micorrizas no fue debida al empleo de fertilizantes si no a un corto periodo de tiempo en el desarrollo del experimento (5 meses desde la inoculación). De hecho, en otros estudios, como el de Garcia-Barreda et al., (2017), la micorriza de *Tuber* no empieza a observarse hasta pasados 12 meses.

Por último, por norma general, en las plantas a las que se les aplica un inóculo no se aplica fertilización (Olivier, 2000). Los resultados de este estudio demuestran que las plantas fertilizadas aumentan su desarrollo respecto a las no fertilizadas. Por tanto, las plantas fertilizadas deberían tener un mayor desarrollo del sistema radical, aumentando las estructuras de puntas terciarias que favorecerían el desarrollo temprano de la micorrización y, además, deberían tener más recursos para aportar al simbionte (Grossnickle 2018). Estas hipótesis se deberían testar con datos futuros del experimento.

Futuras líneas de investigación

Este experimento forma parte del proyecto *TuberRest*, que tiene objetivos más amplios y analiza otros fertilizantes con distintas fuentes de N, concretamente nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y mezcla de todas las fuentes de N (mezcla equimolar de nitrato, amonio y N orgánico (AA)). Por ello, los resultados completos del proyecto permitirán evaluar de forma más completa los efectos de las fuentes de N, tanto en la calidad de plantas de *Q. ilex* y *Q. faginea* como en la micorrización con *T. aestivum* y *T. melanosporum*.

Además, el experimento todavía se está continuando. De hecho, se efectuarán dos cosechas adicionales, al final del segundo año de crecimiento y en el invierno del segundo año (momento de máximo desarrollo esperado de las micorrizas) donde se analizarán de nuevo todos los parámetros morfológicos y fisiológicos y se buscarán indicios de micorrización con *Tuber* spp., así como de hongos espontáneos. Los resultados de estas dos últimas cosechas permitirán evaluar el efecto de las reservas en el segundo año de crecimiento y el efecto final en la micorrización de ambas especies de *Tuber*.

Por otro lado, futuras líneas de investigación podrían testar la respuesta de las mismas plantas de este experimento en su establecimiento en el campo y la evolución de la micorrización en las plantas. Estudios de respuesta en campo permitirían conseguir

una mejora de la supervivencia de estos árboles en proyectos de revegetación y plantaciones truferas. También ayudaría a estudiar la interacción con otros factores, bióticos y abióticos, característicos de ecosistemas mediterráneos.

Por último, sería conveniente estudiar otras especies de árboles, con estas u otras especies de *Tuber* y con la aplicación de fertilizantes con N orgánico. Aumentar el número de especies en estos ensayos permitiría expandir la utilización de las plantaciones truferas en una mayor diversidad de ecosistemas, maximizando a la vez su productividad. También se obtendría más información acerca de cómo interactúan las asociaciones entre especies de árboles y *Tuber*. Igualmente, debería analizarse la respuesta de plantas micorrizadas con distintas especies de *Tuber* a factores de estrés, como heladas primaverales o golpes de calor y sequías estivales, que se espera que aumenten en el contexto de cambio climático (Giorgi and Lionello 2008; Augspurger 2013).

Conclusiones

Las diferencias en la respuesta a los distintos fertilizantes y entre las especies de *Quercus* fueron más sutiles de lo esperado. Si bien *Q. faginea* fue más plástica en su respuesta a las fuentes de N que *Q. ilex*. Mientras que el fertilizante con N inorgánico mejoró ligeramente el desarrollo durante el cultivo en *Q. faginea*, en *Q. ilex* el desarrollo durante el cultivo se maximizó con N orgánico. Aun así, las fuentes de N en el fertilizante no generaron diferencias en la masa, ni en el resto de parámetros fisiológicos. Por todo ello, la utilización de N orgánico en los programas de fertilización demuestra ser una alternativa viable a los fertilizantes convencionales sin reducir la calidad de planta de estas especies. Por otro lado, apenas se encontraron pruebas visuales del establecimiento del *Tuber* spp. en las puntas terciarias de las raíces de las plantas, lo que se atribuyó a un corto periodo de tiempo de desarrollo del experimento, ya que no se encontró micorrización espontánea en ningún tratamiento. Aun así, el fertilizante no pareció inhibir la micorrización más que la ausencia de fertilización ya que tampoco se detectó micorrización en las plantas no fertilizadas. Además, se encontraron evidencias que indican un inicio del establecimiento de la colonización micorrícica tanto en plantas fertilizadas como no fertilizadas, como la modificación de la fenología y el crecimiento del volumen del tallo o puntas micorrizadas aisladas con *Tuber* spp. La fertilización aumentó el desarrollo de las plantas inoculadas, tanto en sus

parámetros morfológicos como en sus parámetros fisiológicos, por lo que emplear fertilizantes en plantas micorrizadas también podría ser una buena elección para aumentar la calidad de planta, especialmente si el fertilizante está basado en fuentes de N orgánicas. Este experimento demuestra que existen opciones para la compatibilización de las técnicas de fertilización basadas en la elección de la fuente de N y la micorrización con *Tuber* en quercíneas.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Real Jardín Botánico Juan Carlos I por prestarnos sus instalaciones para la producción de planta en vivero, al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá por dejarnos utilizar los laboratorios para los análisis y al proyecto TuberRest (CM/JIN/2019-002) por financiar el experimento.

Por supuesto, también agradecer enormemente a todo el equipo que ha colaborado en la parte experimental de este trabajo: Xia Lei, Gabriela Godoy, Karen Báez, Jaime García y, en especial, a Lara Río, por ser la mejor compañera que podría imaginar. Agradecer también a Luis Benito Matías, por su asesoramiento en la realización del experimento, y a José Ángel Sigala, por su ayuda y consejo en el análisis estadístico. Por último, agradecer a mi tutora y directora, Mercedes Uscola, por guiarme, ayudarme y apoyarme en todo momento. Sin ninguna duda, es la persona que más me ha enseñado académicamente en toda mi vida, por lo que siempre le estaré agradecida.

Referencias

Álvarez-Lafuente, A., Benito-Matías, L.F., Peñuelas-Rubira, J.L., Suz, L.M. 2018. Multi-cropping edible truffles and sweet chestnuts: production of high-quality *Castanea sativa* seedlings inoculated with *Tuber aestivum*, its ecotype *T. uncinatum*, *T. brumale*, and *T. macrosporum*. Mycorrhiza 28: 29-38.

Andrés-Alpuente, A., Sánchez, S., Martín, M., Aguirre, Á.J., Barriuso, J.J. 2014. Comparative analysis of different methods for evaluating quality of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. Mycorrhiza 24: 29-37.

Augspurger, C.K. 2013. Reconstructing patterns of temperature, phenology, and frost damage over 124 years: Spring damage risk is increasing. Ecology 94: 41-50.

Aumeeruddy-Thomas, Y., Taschen, E., Richard, F. 2016. Taming the black truffle (*Tuber melanosporum*). Safeguarding Mediterranean food and ecological webs. The Mediterranean region under climate change. A scientific update 533-542.

Benucci, G.M.N., Bonito, G., Falini, L.B., Bencivenga, M. 2012. Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoinensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum Vittad.* and *Tuber borchii Vittad*. Mycorrhiza 22: 383-392.

Bonet, J.A., Fischer, C.R., Colinas, C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. Agronomy for Sustainable Development 26 (1): 69-76.

Brady, M. 2003. The relative cost-efficiency of arable nitrogen management in Sweden. Ecological Economics 47: 53-70.

Britto, D.T., Kronzucker, H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. Journal of Plant Physiology 159: 567-584.

Büntgen, U., Egli, S., Camarero, J.J., Fischer, E.M., Stobbe, U., Kauserud, H., Tegel, W. et al. 2012. Drought-induced decline in Mediterranean truffle harvest. Nature Climate Change 2: 827-829.

del Campo, A.D., Navarro, R.M., Ceacero, C.J. 2009. Seedling quality and field performance of commercial stocklots of containerized holm oak (*Quercus ilex*) in Mediterranean Spain: An approach for establishing a quality standard. New Forests 39: 19-37.

Chen, J.-H. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taiwan, R.O.C. International Workshop on Sustained Management 1-11.

Chen, J., Murat, C., Oviatt, P., Wang, Y., Le Tacon, F. 2016. The black truffles *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum*. En Springer (ed.), True truffle (*Tuber* spp.) in the world, pp. 19-32. Switzerland.

Colinas, C., Capdevila Subirana, J.M., Oliach, D., Fischer, C., Bonet Lledos, J.A. 2007. Mapa de aptitud para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum Vitt*.) en Cataluña. Centre Tecnologic Forestal de Catalunya (CTFC), Catalunya, España.

Cortina, J., Amat, B., Castillo, V., Fuentes, D., Maestre, F.T., Padilla, F.M., Rojo, L. 2011. The restoration of vegetation cover in the semi-arid Iberian southeast. Journal of Arid Environments 75: 1377-1384.

Cortina, J., Bellot, J., Vilagrosa, A., Caturla, R., Maestre, F., Rubio, E., Ortiz de Urbina, J., Bonet, A. 2004. Restauración en semiárido. En Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo, Vallejo V. R., Alloza J. A. (eds). Fundación CEAM, Alicante (España), pp. 345-406.

Delgado-Baquerizo, M., Cavelo, F., Gallardo, A. 2011. Dissolved organic nitrogen in Mediterranean ecosystems. Pedosphere 21: 309-318.

Díaz, G., Carrillo, C., Honrubia, M. 2009. Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. New Forests 38: 215-227.

Domínguez-Lerena, S., Murrias, G., Herrero, N., Peñuelas, J.L. 2001. Cultivo de once especies mediterráneas en vivero. Implicaciones prácticas. Ecología 15: 213-223.

Dominguez Núñez, J.A., Planelles González, R., Rodríguez Barreal, J.A., Saiz de Omeñaca Gonzalez, J.A. 2008. The effect of *Tuber melanosporum Vitt*. mycorrhization on growth, nutrition, and water relations. New Forest 35: 159-171.

Domínguez Núñez, J.A., Planelles González, R., Rodríguez Barreal, J.A., Saiz De Omeñaca González, J.A. 2009. Influence of water-stress acclimation and *Tuber melanosporum* mycorrhization on *Quercus ilex* seedlings. Agroforestry Systems 75: 251-259.

Franklin, O., Cambui, C.A., Gruffman, L., Palmroth, S., Oren, R., Näsholm, T. 2017. The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. Plant Cell and Environment 40: 25-35.

Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. 2003. The nitrogen cascade. BioScience 53: 341-356.

Garcia-Barreda, S., Molina-Grau, S., Reyna, S. 2017. Fertilization of *Quercus* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*: Effects on growth and mycorrhization of two host species and two inoculation methods. iForest 10: 267-272.

García-Montero, L.G., Manjón, J.L., Pascual, C., García-Abril, A. 2007. Ecological patterns of *Tuber melanosporum* and different *Quercus* Mediterranean forests: Quantitative production of truffles, burn sizes and soil studies. Forest Ecology and Management 242: 288-296.

Giorgi, F., Lionello, P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. Global and Planetary Change 63: 90-104.

Grossnickle, S. 2018. Seedling establishment on a forest restoration site – An ecophysiological perspective. Reforesta110-139.

Grossnickle, S.C., MacDonald, J.E. 2018. Seedling quality: history, application, and plant attributes. Forests 9: 1-23.

Grossnickle, S.C., MacDonald, J.E. 2017. Why seedlings grow: influence of plant attributes. New Forests 49: 1-34.

Gruffman, L., Ishida, T., Nordin, A., Näsholm, T. 2012. Cultivation of Norway spruce and Scots pine on organic nitrogen improves seedling morphology and field performance. Forest Ecology and Management 276: 118-124.

Gruffman, L., Palmroth, S., Näsholm, T. 2013. Organic nitrogen uptake of Scots pine seedlings is independent of current carbohydrate supply. Tree Physiology 33: 590-600.

Gryndler, M., Šmilauer, P., Šťovíček, V., Nováková, K., Hršelová, H., Jansa, J. 2017. Truffle biogeography. A case study revealing ecological niche separation of different *Tuber* species. Ecology and Evolution 7: 4275-4288.

Hall, I.R., Yun, W., Amicucci, A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends in Biotechnology 21: 433-438.

Idol, T.W., Diarra, G. 2016. Mycorrhizal colonization is compatible with exponential fertilization to improve tree seedling quality. Journal of Plant Nutrition 40: 283-297.

Jacobs, D.F., Landis, T.D. 2009. Hardening. En Dumroese, R. K., Luna, T., Landis, T. D. (eds.), Nursery manual for native plants: A guide for tribal nurseries - Volume 1: Nursery management. Agriculture Handbook 730, pp. 217-227. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washintgton DC, US.

Jaillard, B., Barry-Etienne, D., Colinas, C., De Miguel, A.M., Genola, L., Libre, A., Neveu, P. et al. 2014. Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. Forest Systems 23: 364-377.

Khamwichit, W., Sanongraj, W., Sanongraj, S. 2006. Study of environmental impacts before and after using the organic-chemical fertilizer in rice paddy fields. Walailak Journal of Science and Technology 3: 51-68.

Landis, T., Tinus, R., McDonald, A.J.S., Barnett, J.P. 1989. Seedling Nutrition and Irrigation. The Container Tree Nursery Manual Vol. 4. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.

LeBauer, D.S., Treseder, K. 2008. Nitrogen limitations of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. Ecology 89: 371-379.

Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J. et al. 2006. The Mediterranean climate: An overview of the main characteristics and issues. Developments in Earth and Environmental Sciences, Lecce, Italy, pp. 1- 26.

Martín Herrero, J., Herranz Sanz, J.M., Martínez Lirola, M.J. 2004. Quejigares (*Quercus faginea subsp. faginea*). En Manuales de gestión Natura 2000, Dirección General de Medio Ambiente. Consejería de Medio Ambiente, Castilla-La Mancha.

Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., Appel, T. 2001. Nitrogen. En Principles of plant nutrition. Mengel K., Kirkby EA, Kosegarten H., Appel T. (eds). Springer, Dordrecht. pp. 397-434.

Nadim, M., Saidi, N., Hasani, I., El, M., Assad, H. 2016. Effects of some environmental parameters on mycelia growth of finnish truffle *Tuber maculatum*. International Journal of Engineering and Applied Sciences 3: 1-5.

Näsholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. New Phytologist 182: 31-48.

Öhlund, J., Näsholm, T. 2001. Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. Tree Physiology 21: 1319-1326.

Oliet, J., Planelles, R., Segura, M.L., Artero, F., Jacobs, D.F. 2004. Mineral nutrition and growth of containerized *Pinus halepensis* seedlings under controlled-release fertilizer. Scientia Horticulturae 103: 113-129.

Oliet, J.A., Salazar, J.M., Villar, R., Robredo, E., Valladares, F. 2011. Fall fertilization of holm oak affects N and P dynamics, root growth potential, and post-planting phenology and growth. Annals of Forest Science 68: 647-656.

Olivier JM. 2000. Progress in the cultivation of truffles. In: Science and cultivation of edible fungi, vol 2. Van Griensven LJLD (ed) Balkema, Rotterdam (Amsterdam) pp 937–942.

Paungfoo-Lonhienne, C., A Lonhienne, T.G., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R.I., Gamage, H.K. et al. 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. PNAS, 105: 4524-4529.

Pilbeam, D.J. 2018. The utilization of nitrogen by plants: A whole plant perspective.Annual Plant Reviews, 42: 305–351.

Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2020). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-150, https://CRAN.R-project.org/package=nlme.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Raven, J.A., Wollenweber, B., Handley, L.L. 1992. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. New Phytologist, 121:19-32.

Rey Benayas, J.M., Camacho-Cruz, A. 2004. Performance of *Quercus ilex* saplings planted in abandoned Mediterranean cropland after long-term interruption of their management. Forest Ecology and Management 194: 223-233.

Rey Benayas, J.M., Newton, A.C., Diaz, A., Bullock, J.M. 2009. Enhancement of biodiversity and ecosystem services by ecological restoration: A meta-analysis. Science 325: 1121-1124.

Reyna, S., Garcia-Barreda, S. 2014. Black truffle cultivation: A global reality. Forest Systems 23: 317-328.

Reyna, S., García-Barreda, S. 2008. European black truffle: its potential role in agroforestry development in the marginal lands of Mediterranean calcareous mountains. En Rigueiro-Rodríguez, A., McAdam, J., Mosquera-Losada, M. (eds.), Agroforestry in Europe Current status and future prospects, Springer. Valencia (España), pp. 295-317.

Rodà, F., Retana, J., Gracia, C.A., Bellot, J. 1999. Ecology of Mediterranean evergreen oak forests. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Samils, N., Olivera, A., Danell, E., Alexander, S.J., Fischer, C., Colinas, C. 2008. The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. Economic Botany, 62:331-340.

Sigala, J.A., Oliet, J.A., Uscola, M. 2020. Assessing physiological mechanisms of frost tolerance and cold acclimation in pine seedlings as influenced by organic nitrogen (Capítulo 2) En: Nitrogen nutrition in pine seedlings: the role of organic N in promoting tolerance and acclimation to abiotic stress. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Madrid.

Sigala, J.A., Oliet, J.A., Uscola, M. 2020. Nitrogen forms effects on seedling morphology and drought tolerance of two pine species from northern Mexico (Capítulo 4) En Nitrogen nutrition in pine seedlings: the role of organic N in promoting tolerance and acclimation to abiotic stress. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Madrid.

Sigala, J.A., Uscola, M., Oliet, J.A., Jacobs, D.F. 2020. Drought tolerance and acclimation in *Pinus ponderosa* seedlings: the influence of nitrogen form. Tree physiology 40: 1165-1177.

Stanturf, J.A., Palik, B.J., Dumroese, R.K. 2014. Contemporary forest restoration: A review emphasizing function. Forest Ecology and Management 331: 292-323.

Stobbe, U., Egli, S., Tegel, W., Peter, M., Sproll, L., Büntgen, U. 2013. Potential and limitations of Burgundy truffle cultivation. Applied Microbiology and Biotechnology 97: 5215-5224.

Sun, B., Zhang, L., Yang, L., Zhang, F., Norse, D., Zhu, Z. 2012. Agricultural non-point source pollution in China: Causes and mitigation measures. Ambio 41: 370-379.

Suz, L.M., Martín, M.P., Oliach, D., Fischer, C.R., Colinas, C. 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum-Quercus ilex* orchards. FEMS Microbiology Letters 285: 72-78.

Le Tacon, F., Zeller, B., Plain, C., Hossann, C., Bréchet, C., Robin, C. 2013. Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ^{13}C pulse-labeling technique PLoS ONE 8: e64626.

Taiz L., Zeiger E. 2010. Plant Physiology, 5th edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA

Talbot, J.M., Treseder, K.K. 2010. Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. Pedobiologia 53: 169-179.

Therville, C., Mangenet, T., Hinnewinkel, C., Guillerme, S., De Foresta, H. 2013. Is truffle growing a response to sustainable development and heritage issues in Mediterranean territories the case of Uzès, southern France. Forests Trees and Livelihoods 22: 257-274.

Timmer, V.R., Aidelbaum, A.S. 1996. Manual for exponential nutrient loading of seedlings to improve outplanting performance on competitive forest sites. Ontario.

Timmer, V.R., Armstrong, G. 1987. Diagnosing nutritional status of containerized tree seedlings: Comparative plant analyses 1. Soil Science Society of America Journal 51: 1082.

Uscola, M., Oliet, J.A., Villar-Salvador, P., Díaz-Pinés, E., Jacobs, D.F. 2013. Nitrogen form and concentration interact to affect the performance of two ecologically distinct Mediterranean forest trees. European Journal of Forest Research 133: 235-246.

Uscola, M., Salifu, K.F., Oliet, J.A., Jacobs, D.F. 2015a. An exponential fertilization dose-response model to promote restoration of the Mediterranean oak *Quercus ilex*. New Forests 46: 795-812.

Vargas Ríos, O. 2011. Ecological restoration: biodiversity and conservation. Acta Biológica Colombiana 16: 221-246.

Villar-Salvador, P., Heredia, N., Millard, P. 2009. Remobilization of acorn nitrogen for seedling growth in holm oak (*Quercus ilex*), cultivated with contrasting nutrient availability. Tree Physiology 30: 257-263.

Villar-Salvador, P., Nicolás Peragón, J.L., Heredia Guerrero, N., Uscola Fernández, M. 2014. *Quercus ilex* L. Producción y manejo de semillas y plantas forestales 226-250.

Villar-Salvador, P., Oliet Pálá, J., Heredia Guerrero, N., Uscola Fernández, M., Goicoetxea, P. 2014. *Quercus faginea* Lam. Producción y manejo de semillas y plantas forestales 206-225.

Villar-Salvador, P., Peñuelas, J.L., Nicolás-Peragón, J.L., Benito, L.F., Domínguez-Lerena, S. 2013. Is nitrogen fertilization in the nursery a suitable tool for enhancing the performance of Mediterranean oak plantations? New Forests 44: 733-751.

Villar-Salvador, P., Puértolas, J., Cuesta, B., Peñuelas, J.L., Uscola, M., Heredia-Guerrero, N., Rey Benayas, J.M. 2012. Increase in size and nitrogen concentration enhances seedling survival in Mediterranean plantations. Insights from an ecophysiological conceptual model of plant survival. New Forests 43: 755-770.

Villar-Salvador, P., Uscola, M., Jacobs, D.F. 2015. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. New Forests 46: 813-839.

Villar-Salvador, P., Valladares, F., Domínguez-Lerena, S., Ruiz-Díez, B., Fernández-Pascual, M., Delgado, A., Peñuelas, J.L. 2008. Functional traits related to seedling performance in the Mediterranean leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*: Insights from a provenance, fertilization, and rhizobial inoculation study. Environmental and Experimental Botany 64: 145-154.

Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, S., Wang, Y. 2018. What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers? Journal of Cleaner Production 199: 882-890.

Warren, C.R., Adams, M.A. 2004. Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis. Trends in plant science 9: 270-4.

Warren, C.R., Adams, M.A., Chen, Z. 2000. Is photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? Australian Journal of Plant Physiology 27: 407-416.

Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. 2016. True truffle (*Tuber* spp.) in the world. Springer, Switzerland.

Material suplementario

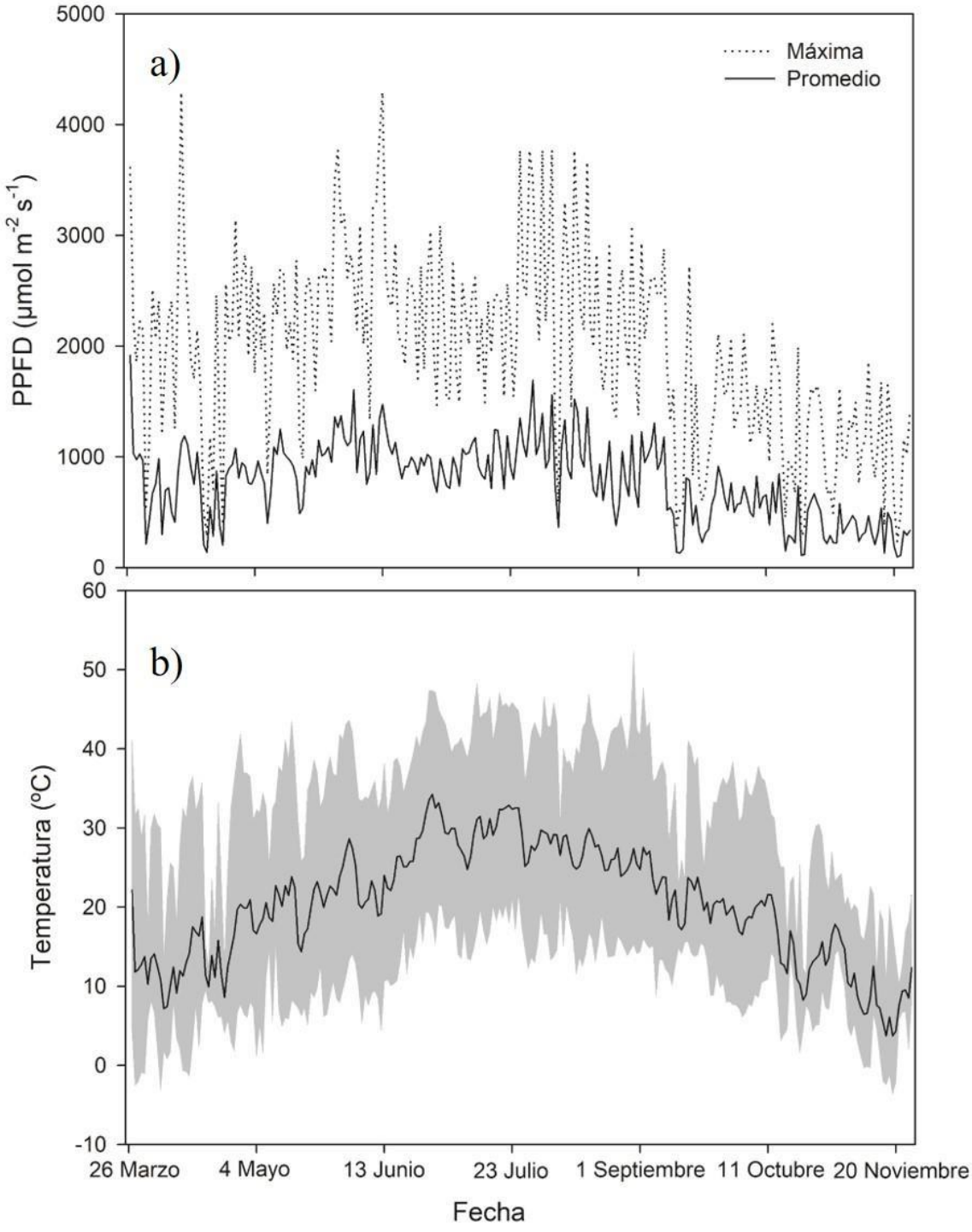


Figura S1. Radiación (a) diaria máxima (línea discontinua) y promedio (línea continua) de las horas de sol (a) y temperatura (b) diaria media (línea continua), máxima y mínima (área sombreada) en el interior del túnel de cultivo. Los datos son los promedios de dos sensores grabadores de datos de temperatura y radiación (Pendant Temp/luminosidad, Onset, EEUU), ubicados en puntos separados del túnel de cultivo a la misma altura que las plantas, aunque sin recibir sombra de ellas y programados para tomar datos cada hora.