CONTROL DE CALIDAD EN LA PLANTA MICORRIZADA CON *Tuber melanosporum* Vitt .

REYNA, S. (1); BORONAT, J. (2); PALOMAR, E.(3)

(1) Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. CEAM. c/ Darwin 14. Parque Tecnológico. Paterna. 46980 Valencia. España santiago@ceam.es.

(2) Escuela Politécnica Superior de Gandía. I. T. Forestal Universidad Politécnica de Valencia. Cra. Nazaret Oliva s/n. 46730 Gandía. Valencia. España

(3) Viveros Vivertruf. C/ Castillo 52. Viver. 12460 Castellón. España

RESUMEN

Se plantea la problemática del control de calidad de la planta micorrizada con trufa (*Tuber melanosporum*), proponiéndose los sistemas necesarios para una correcta producción. Se expone una metodología de control del grado de micorrización a través de muestreos volumétricos de substrato de cultivo y se aplica a planta procedente de 5 viveros españoles, comparando los resultados con otra metodología basada en muestreos porcentuales. Se proponen los baremos de calidad para la planta micorrizada y de acuerdo con ellos se evalúa el conjunto de planta muestreada.

P C: Trufa, *Tuber*, micorrización, *Quercus ilex*, vivero, control calidad.

SUMMARY

The problems of the quality control in the mycorrhized plant with truffle (*Tuber melanosporum*) are presented, suggesting the necessary systems for a correct production. A control methodology of the mycorrhization degree through the volume samples of cultivation substratum is shown and is applied to the plant coming from 5 Spanish nurseries, comparing the results with a different methodology based on percentage samples. The quality scales for the mycorrhized plant are suggested, and, according to them, the group of studied plants is assessed.

K.W.: Truffle, *Tuber*, mycorrhization, *Quercus ilex*, nursery, quality control.

INTRODUCCION

La producción trufera en España tiene una importancia creciente debido a sus buenos precios entre las 25.000 pta/kg y las 95.000 (1998), con tendencia alcista, y a las escasas alternativas agrícolas y de desarrollo industrial que generalmente tienen las áreas truferas (Reyna *et al* 1999).

La producción de trufa tiende cada vez más a la implantación de plantas de encina, roble, avellano etc micorrizadas con el hongo mediante diversos procedimientos de inoculación esporal. Sin embargo, la planta micorrizada con *Tuber melanosporum* no tiene, en España, una regulación, en cuanto a procesos de producción y control de calidad, que permita la existencia de un certificado que valide la planta de modo que el truficultor tenga una garantía de calidad. Esta cuestión es importante si se considera que únicamente mediante material muy costoso y unos conocimientos bastante especializados puede llegar a diferenciarse unas micorrizas de otras. De otra parte, dado que la producción de carpóforos en las plantaciones comienza entre el 6º y 12º año, queda todo a la "buena fe", ya que difícilmente se podrá reclamar, a los 12 años, si la culpa era de la planta o de las prácticas culturales, adecuación del terreno etc. (Reyna 2000a). Por tanto, de no existir este tipo de controles, el futuro truficultor queda expuesto al riesgo de productores de planta incompetentes o desaprensivos. En reuniones coordinadas por el INIA han sido propuestas diversas metodologías para evaluar la calidad de la planta micorrizada (Fischer & Colinas 1997; Reyna 1997; Palazón *et al* 1997, 1999). Por el momento no existe un acuerdo en la más adecuada que permita a los viveristas españoles poder defender comercialmente sus plantas ante la competencia foránea que sí posee, en su mayor parte, unos controles de calidad en sus respectivos países de origen.

A pesar de que las micorrizas del género *Tuber* de origen europeo son identificables en su mayoría (Zambonelli *et al*. 1993, Meotto *et al*. 1995, Saez & De Miguel 1995, ETAYO & DE MIGUEL, 1998), existen especies que se están importando de países asiáticos, como *Tuber hymalayensis* o *T. indicum*, cuyas micorrizas, desde el punto de vista morfológico, no son distinguibles de las de *T. melanosporum* (Massimo *et al*. 1996, Comandini & Pacioni 1997), y sólo serían diferenciables mediante análisis de ADN, por ello es necesario asegurar que el proceso de producción y, muy especialmente, el inóculo empleado es correcto sin ningún género de dudas.

MATERIAL Y METODOS

Para lograr un control adecuado de la calidad de la planta inoculada con *Tuber melanosporum* se propuso un procedimiento de trabajo con tres fases independientes que se aplican a cada uno de los lotes de plantas (Reyna *et al* 2000b) entendiendo por lote, de acuerdo con Palazón *et al* (1997), el

conjunto de plantas que tienen: una misma procedencia de la semilla, se siembran a la vez, se inoculan con el mismo material y reciben las mismas prácticas de cultivo.

Los controles de los métodos de cultivo debe comprender los siguientes puntos: Desinfección de los substratos de cultivo; desinfección y origen de las semillas; agua de riego sin propágulos micorrizógenos; vivero alejado de áreas forestales; contenedores de cultivo nuevos o desinfectados; cultivo en invernadero con suelo aislado; sistema de desinfección en la entrada y de las herramientas utilizadas. Los controles sobre el material inoculante son imprescindibles y debe comprobarse que los carpóforos corresponden sin ningún género de dudas a *T. melanosporum* y al igual que en los caso anteriores someterlos a un proceso de lavado y desinfeción. Mayor detalle se encontrará en Reyna *et al* (2000b)

Para la comprobación de la existencia efectiva de micorrizas de *Tuber melanosporum* los primeros reconocimientos pueden comenzar a los 4 ó 5 meses de la inoculación, aunque es preferible que para la evaluación definitiva la planta tenga al menos una savia completa. El reconocimiento de las micorrizas se realiza al microscopio comprobando el manto y la ornamentación de espínulas, pueden seguirse las claves y descripciones de MEOTTO *et al*. (1995), Zambonelli *et al*. (1993) y Etayo & De Miguel (1998).

Control cuantitativo de las micorrizas**:** los sistemas de control del grado de micorrización más frecuentemente aplicados obtienen datos porcentuales. Es el caso de los propuestos por Bencivenga *et al* (1995) o los ya indicados de Fischer & Colinas (1997), se comprueba que una planta o un lote de plantas tienen un determinado porcentaje de ápices radiculares micorrizados con una especie determinada de *Tuber*. Evidentemente el dato es pobre, puesto que se desconoce cuántos ápices tiene la planta y, consecuentemente, la cantidad de inóculo que estamos adquiriendo. Para subsanar esta deficiencia, el sistema que se desarrolla, obtiene datos relativos al número de micorrizas por planta, al % de micorrización y al % de contaminaciones con otras micorrizas. Está basado en la extracción de muestras cilíndricas de substrato y raíces (Reyna, 1997, 1999)

En este ensayo se tomaron 7 muestras de 12 plantas de *Quercus ilex* cada una procedente de 7 lotes de producción de 5 viveros diferentes, todos ellos productores de planta micorrizada con *Tuber melanosporum*. El muestreo en volumen de los cepellones se realiza sacando con un sacabocados una muestra cilíndrica de 1,4 cm de diámetro en la zona media del contenedor con una longitud equivalente a la anchura del contenedor a esa altura. La longitud varía con el tipo de contenedor. Esto supone un volumen muestreado del orden de 7 a 9 cc., equivalente, aproximadamente, a un 2% del volumen del contenedor. La muestra cilíndrica se extrae en sentido horizontal. Las muestras extraídas en la zona media del contenedor son suficientes, ya que en ensayos previos no se obtuvieron diferencias significativas entre el estrato medio y el superior, ni entre el medio y el inferior, para una muestra de 10 plantas (Reyna 1999).

Cada muestra se pesa y se añaden unos 100 cc. de agua junto a un detergente comercial (Calgón) y se someten a un baño de ultrasonidos de 15 minutos. A las 24 horas se da un nuevo baño de ultrasonidos y se pasa el contenido del envase a un vaso de precipitados de 0,5 l. incorporando agua hasta completar los 500 cc. Se realizan varias decantaciones sucesivas incorporando agua y decantando al cabo de 1 minuto. Con ello se logra la eliminación de arcillas, limos y parte de la materia orgánica. La manipulación se hace con el máximo cuidado para evitar la pérdida de ápices radiculares. Tras sucesivas decantaciones y tamizados se observa a la lupa binocular y microscopio, contándose todas las micorrizas, ápices sin micorrizar y micorrizas contaminantes. Todas las referencias se calculan en volumen; la alternativa de referirlo a peso de la muestra daba mayores diferencias debido a la diferente humedad, huecos o falta de uniformidad del substrato.

El muestreo porcentual se desarrolla sobre las mismas 12 x 7 plantas en las que se tomó la muestra en volumen. Se siguió el procedimiento propuesto por Fischer & Colinas (1997) cuya metodología consiste, resumidamente, en la eliminación completa del substrato dejando libre el sistema radical, para posteriormente trocearlo en porciones de una longitud 2 a 3 cm, sobre los que se realiza un muestreo aleatorio hasta haber observado un mínimo de 250 ápices radiculares. Se contabilizan el número de micorrizas de *T. melanosporum*, ápices no micorrizados y contaminaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del muestreo volumétrico y del muestreo porcentual para los 7 lotes se indican

en la **tabla 1 y figura 1**. Se detecta una gran variabilidad en el número de micorrizas por planta, para todos los lotes, aunque se amortigua al expresar los datos en %. Las medias de micorrización expresadas en % obtenidas para todos los lotes por un procedimiento y otro son respectivamente del 32,1% y 33,2 %, lo cual resulta una muy buena aproximación. La correlación lineal entre los % obtenidos para cada lote por un método y otro es de R^2 = 0,87 y significación de 0,0022, lo cual indica también un buen nivel de aproximación entre ambas metodologías. Unicamente en el lote 3 la diferencia es más sensible (14 puntos porcentuales), aunque en ninguno de los casos existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por uno u otro procedimiento.

Por el contrario, la relación entre los % de micorrización y el número de micorrizas por planta es escasa, R^2= 0,42. Así, en un lote un punto (%) significa 21 micorrizas y para otro lote 120 micorrizas, es decir 6 veces más. La justificación de esta situación está, evidentemente, en los sistemas radicales puesto que plantas con diferentes técnicas de cultivo pueden dar partes aéreas similares y estructuras radicales muy diferentes.

Las diferencias significativas entre lotes se presentan en la **tabla 2**

Por lo que respecta a las contaminaciones con otro tipo de micorrizas diferentes del género *Tuber*, los % de contaminaciones obtenidos por uno y otro sistema no son tan aproximados como para el % de micorrización con *T. melanosporum*, aunque de cualquier forma no son unas diferencias exageradas. Así en valores medios por el sistema porcentual se obtienen 2,10% y para el volumétrico 3,28 % de ápices micorrizados con otras especies. El coeficiente de regresión entre ambas series es R^2 = 0,38. El método volumétrico ofrece unos resultados de porcentajes de contaminación más altos que el método porcentual.

CONCLUSIONES

El sistema de muestreo en volumen permite ofrecer datos medios del número de micorrizas por planta, que es en definitiva el "producto activo" de una planta micorrizada, el inóculo que adquirimos. Mediante ambos sistemas, volumétrico y porcentual, se obtienen datos de % de micorrización similares.

En los datos relativos a contaminaciones con otras micorrizas, la aproximación entre los dos métodos es menor, sin embargo el volumétrico detecta mayores porcentajes de micorrización contaminante, por lo que se considera más adecuado, ya que de cara a la certificación es más prudente.

El tiempo empleado en realizar un sistema de exploración u otro difiere sensiblemente. El sistema volumétrico emplea entre 1/3 y ¼ del tiempo requerido por el otro. Por otra parte, el sistema volumétrico propuesto, es un ensayo no destructivo que permite realizar un seguimiento posterior de las mismas plantas.

En ambos métodos se presentan grandes dificultades de evaluación cuando se utilizan substratos "pañal" (nombre comercial *Melfert*), dada la imposibilidad de separar las radículas del substrato.

Criterios de calidad establecidos: se considera por distintos autores (Bencivenga e*t a*l 1995, Fischer & Colinas 1997, Palazon *et al*, 1997, 1999) que a partir de un 25% de micorrización, según unos, y de un 33 % de micorrización, según otros, la planta ya es de calidad. Dado que estos datos se obtienen, siempre sobre una observación mínima de 250 ápices, aunque en algún caso esto no se indica, este tipo de criterio únicamente garantizaría entre 62 y 82 micorrizas por planta. Consideraremos esta cifra, redondeada hasta 100, como nivel mínimo para calificar una planta como micorrizada, un número inferior se considera insuficiente.

A partir de los resultados en los 7 lotes se valoran las diferentes calidades de acuerdo con los percentiles. Así al percentil 10% (260 micorrizas); percentil 25% (516 micorrizas/planta), 50% (1512 micorrizas/planta), 75% (2479 micorrizas /planta) y 85 % (2892 micorrizas /planta). Redondeado, las calidades propuestas para la planta son: Calidad Insuficiente de 1 a 100 micorrizas por planta, Calidad Escasa de 101 a 250 mic/planta. Calidad Aceptable de 251 a 500 mic/planta. Calidad Buena de 501 a 1500 mic/planta. Calidad Muy buena 1501 a 3000 mic/planta. Calidad Excelente más de 3000 mic /planta

El grado de contaminación con otras micorrizas admisible no debe superar el 25 % sobre el número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*, este valor está en el mismo entorno que los propuestos en las metodologías ya citadas. De acuerdo los criterios establecidos, los 7 lotes estudiados tienen una

calidad media muy buena, con 2499 micorrizas por planta, y tan sólo uno sería rechazado por exceso de contaminaciones. Además, la planta debe cumplir los criterios de calidad normales para planta de vivero (PEÑUELAS Y OCAÑA 2000)

AGRADECIMIENTOS

La fundación CEAM esta financiada por la Generalitat Valenciana y Bancaixa. El presente trabajo se ha podido realizar en buena medida gracias a la financiación del Instituto Valenciano de la Mediana y Pequeña Empresa (IMPIVA), de la Generalitat Valenciana a través del Plan de Infraestructura Tecnológica de Apoyo a la Innovación.

BIBLIOGRAFIA

BENCIVENGA, M.; GOVI, G.; GRANETTI, B.; PALENZONA, M.; PACIONI, G.; TOCCI, A.; ZAMBONELLI, A.; (1995); *Presentazione del metodo di valutazione delle piante micorrizate con funghi del gen. Ttuber bassato sulla caractterzzazione morfologica delle micorrize*. Ined

COMANDINI, O.; PACIONI, G.; (1997).*Mycorrhizae of Asian black Truffles,* Tuber himalayense *and T. indicum. Mycotaxon*, Volume LXIII, pp 77-86 June-August 1997.

ETAYO, M.L.; DE MIGUEL A.M. (1998). *Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivad situada en Olóriz Navarra.* Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra,

FISCHER C. & COLINAS.C (1997). *Método de control de planta de* Quercus ile*x inoculada con* Tuber melanosporum. Reunion sobre truficultura Zaragoza

MASSIMO, G.;BENCIVENGA, M.; GARCIA MONTERO L.G.; MANJON, J.L.; (1996) Tuber indicum, *un tartufo orientale simile a* Tuber melanosporum. Micologia e Vegetazione Mediterranea Vol XI nº 2 pp 107 -114 Italia

MEOTTO F.; NOSENZO C.; FONTANA A.; (1995). *Le micorrice pregiate di* Tuber. L'Informatore Agrario 31/95, 41-45

PALAZON C.; DELGADO I.; CARTIÉ G.; BARRIUSO; (1997). *Metodología del análisis de planta micorrizada con* Tuber melanosporum Reunión sobre truficultura Zaragoza

PALAZON C.; DELGADO I.; CARTIÉ G.; DELGADO, I; BARRIUSO J.;. ESTEBAN H.: 1999. *Propuesta de una metodología de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus spp.*) micorrizada con* T. melanosporum *para la obtención en España de de la etiqueta de calidad*. 5º C. International Science Culture de la Truffe . Aix en Provence

REYNA, S.; 1997 *Metodología del análisis de planta micorrizada con* Tuber nigrum (Ined.) Reunion sobre truficultura Zaragoza 1997

REYNA, S.; 1999. *Aproximación a una selvicultura trufera*. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenierosde Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

REYNA,S; DE MIGUEL, A; HERNÁNDEZ, A; ESTEBAN, H.; 1999. *Historia y perspectiva de la truficultura en España.* 5º Congres International Science et la Culture de la Truffe . Aix en Provence

REYNA, S.; PÉREZ BADÍA, R., TRULL J. HERRERO, M. (2000) a. *Trufa , Truficultura y Selvicultura Trufera.* 229 pag. Editorial Mundiprensa.

REYNA, S., BORONAT, J.; PALOMAR, E. (2000)b. *Control De Calidad En La Planta Micorrizada Con* Tuber Melanosporum Vitt *Producida Por Viveros Comerciales*. Revista MONTES nº 61 pag 17-24

ZAMBONELLI A, SALOMONI S, PISI A.; 1993 *Caraterizzacione anatomo-morfologica delle micorrice di Tuber ssp. su Quercus pubescenns Willd***.** mic. Ital.1993, 3 , 73-90

PEÑUELAS Y OCAÑA (2000) *Cultivo De Plantas Forestales En Contenedor* 190 pgs. Mundiprensa

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1:Valores medios e intervalo de confianza (95 %) para lotes analizados por los dos métodos ensayados

	Numero de micorrizas por planta		**% de micorrización con *Tuber. melanosporum***		**% de otras micorizas**	
Lotes	***Tuber melanosporum***	**Otras micorrizas**	**Método volumen**	**Método porcentual**	**Método volumen**	**Método porcentual**
1	4736 ± 2312	292 ± 409	55.6 ± 14.5	45.2 ± 12.7	3.9 ± 4.6	3.9 ± 4.9

2	904 ± 376	56 ± 50	37.4 ± 11.1	42.8 ± 6.7	2.1 ± 2.4	0.7 ± 0.7
3	1678 ± 2190	57 ± 80	11.9 ± 7.7	25.3 ± 12	1.3 ± 2.2	1.2 ± 1.6
4	352 ± 466	230 ± 391	7.4 ± 6.3	8. ± 4.6	2.5 ± 3.8	2.9 ± 2.9
5	3493 ± 1328	118 ± 104	48.8 ± 13.4	45.2 ± 11.1	1.4 ± 1.5	0.5 ± 0.5
6	2966 ± 2751	352 ±441	22.4 ± 12	24.8 ± 11.1	3.6 ± 3.4	2.6 ± 2.7
7	3365 ± 1904	448 ± 265	41.± 11	41 ± 8.8	8.1 ± 6.1	2.9 ± 2.8
Todos l	**2499 ± 1451.**	**222 ± 140**	**32± 17**	**33.2 ± 13.1**	**3.0 ± 2.2**	**2.10 ± 1.20**

Tabla 2: Diferencias significativas entre lotes para el porcentaje (%) de micorrización y el número (nº) de micorrizas por planta (cálculo volumetrico)

Lote	1	2	3	4	5	6
1						
2	**nº**					
3	**% nº**	**%**				
4	**% nº**	**%**				
5			**%**	**% nº**		
6	**%**				**%**	
7	**%**		**%**	**% nº**		**%**

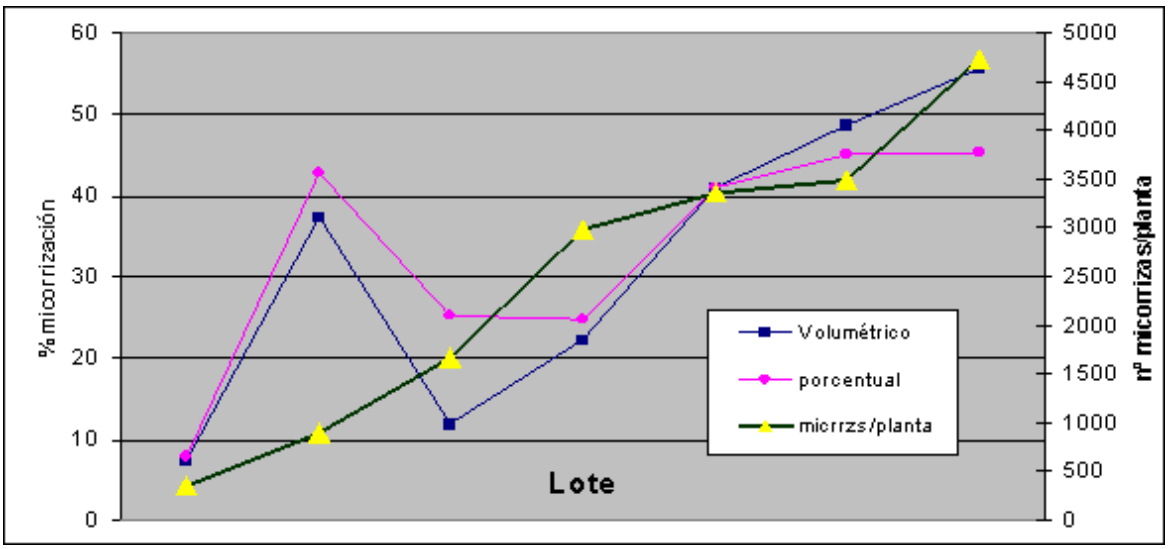

Figura 1: Comparación de los % de micorrización obtenidos por los dos procedimientos ensayados, y numero de micorrizas por planta para cada uno de los lotes analizados