

TÉCNICAS DE INOCULACIÓN DE ÁRBOLES ADULTOS CON *TUBER MELANOSPORUM* Vitt.

REYNA, S.(1,3); RODRIGUEZ BARREAL, J.A. (2); FOLCH, L. (1); PÉREZ-BADÍA, R. (3); DOMÍNGUEZ, A. (2); SAIZ-DE-OMECANA, J.A. (2); ZAZO (2)

- (1) Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. CEAM. C/ Charles R. Darwin, 14. Parque Tecnológico. 46980 Paterna. Valencia. santiago@ceam.es laura@ceam.es
- (2) Escuela T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. 28040. Madrid. E-mail: jabarreal@montes.upm.es
- (3) Escuela Politécnica Superior de Gandía, Universidad Politécnica de Valencia. Crta. Nazaret Oliva s/n. 46730. Gandía. Valencia. mrperez@bvg.upv.es

RESUMEN

La pérdida de las producciones naturales de trufa se origina, en parte, debido a la intensa recolección lo que impide una reinoculación natural de nuevos árboles. Cuando se extrae del suelo, con destino a consumo humano, se retiran del medio el 100% de las esporas de la trufa, que no son reincorporadas con los excrementos del consumidor.

En este trabajo se presentan técnicas de inoculación con trufa en árboles adultos y los resultados obtenidos en la formación de micorrizas a lo largo de 3 años.

Los procedimientos de inoculación que se ensayan son básicamente de dos tipos. En el primero se incorpora el inóculo trufero al suelo y se espera a que lleguen las raíces a la zona del suelo inoculada. En el segundo se disponen “trampas” para raíces, mediante diversos procedimientos, en las que se produce una concentración superior de raicillas, que son posteriormente inoculadas.

Los resultados obtenidos tras los primeros análisis de micorrizas nos revelan la gran variabilidad micorrízica presente en el suelo, a pesar de la competencia, se han conseguido establecer micorrizas de *Tuber melanosporum* y existe un fondo de ápices sin micorrizar muy importante que puede haberse fomentado gracias a las prácticas culturales aplicadas y que en principio permitiría una progresión de la inoculación.

P.C.: Inoculación, encinar, micorrizas, *Tuber melanosporum*

SUMMARY

Decreases in the natural production of truffles can be attributed in part to intensive harvesting practices that prevent the natural inoculation of new trees. When it is extracted from the ground for the human consumption, 100% of its spores are removed from the habitat and are not re-incorporated by means of consumer excrement. This paper reports truffle-inoculation techniques in adult trees and the results obtained over a three-year period in relation to mycorrhiza formation.

Basically, two types of inoculation techniques were tested. The first involved inoculating the soil with truffle and waiting for the tree roots to reach the inoculated zone. In the second, root “traps” were set; i.e. various procedures were followed to produce a greater concentration of rootlets to which the inoculation was subsequently applied.

Initial analysis of results of the inoculation techniques reveals extensive mycorrhizal variability within the soil. In spite of the competition, *Tuber melanosporum* mycorrhiza have become established. There is also a very important pool of un-mycorrhized apices which may have been stimulated by the culture procedures applied and which, in principle, should permit the inoculation to progress.

K.W.: Inoculation, evergreen oak grove, mycorrhizes, *Tuber melanosporum*.

INTRODUCCIÓN

La producción natural de trufa descende, entre otros motivos, por la intensa y desordenada recolección a la que se someten los rodales truferos, que impide una reinoculación natural de nuevos árboles, ya que *Tuber melanosporum* es una especie zoócora y al retirar el cuerpo fructífero se retiran el 100 % de las esporas. A ello se suma la excesiva espesura alcanzada, tanto en el arbolado como en el estrato matorral, motivada por el abandono del aprovechamiento de leñas y el descenso del pastoreo, (Reyna, 2000).

Por tanto, si las condiciones selvícolas no son las adecuadas y el inóculo natural es reducido a cifras mínimas, la evolución previsible para los montes naturales productores de trufa es la pérdida de la mayor parte de la producción en los próximos 20 – 30 años.

La inoculación de planta en vivero, cultivada en condiciones controladas, con hongos de micorriza, ha supuesto el desarrollo de técnicas más o menos depuradas. Son numerosas las referencias bibliográficas al respecto, pero las técnicas más extendidas, y de carácter más práctico, son expuestas por Honrubia *et al* (1992,1993), y más concretamente para *Tuber melanosporum* por Palazón *et al* (1999) que analiza las ventajas e inconvenientes de algunas de ellas.

En el caso de inoculaciones en árboles adultos no se han localizado referencias bibliográficas,

salvo algunas experiencias italianas de inoculación en raíces de árboles adultos que se hicieron crecer en un recipiente (Gregori com.pers) cuya extensión a un procedimiento práctico y de carácter extensivo es, desde el inicio, totalmente inviable dada la extremada laboriosidad y coste del método. Reyna (1992) indica la posibilidad de inocular árboles adultos mediante la preparación de sistemas radicales y la posterior inoculación con suspensión esporal. En Francia, existen experiencias de reconversión de truferas de *Tuber brumale* a *T. aestivum* mediante inoculación esporal superficial, (Frochot *et al*, 1999).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se presentan técnicas de inoculación con trufa en árboles adultos y los resultados obtenidos en la formación de micorrizas a lo largo de 3 años. Los procedimientos de inoculación que se ensayan son básicamente de dos tipos. En el primero se incorpora el inóculo trufero al suelo y se espera a que lleguen las raíces a la zona del suelo inoculada. En el segundo se disponen “trampas” para raíces, mediante diversos procedimientos, en las que se produce una concentración superior de raicillas, que son posteriormente inoculadas. Ambas técnicas están descritas más ampliamente en Reyna (1999) y Reyna *et al* (1999).

Los árboles adultos elegidos se encuentran en una parcela de 2 ha situada en el monte de los Palancares de El Toro, Castellón (Figura 1), a 1100 metros de altitud. Se trata de una zona llana con árboles diseminados, una pendiente inferior al 3% y destinada a la siembra del cereal en los últimos años.

La vegetación diseminada de la zona central está constituida por 28 matas de quejigo (*Quercus faginea*) con 3 – 15 pies cada una de ellas y de una altura de unos 5 m; 2 pinos laricios (*Pinus nigra*) de unos 7 m de altura, así como vegetación herbácea de carácter ruderal y alguna labiada de pequeño tamaño. La zona perimetral está constituida por *Q. ilex* y *Q. faginea* que crecen aisladamente. Los sistemas radicales de esta masa se extienden, en su mitad sur, por la zona labrada descrita anteriormente. En conjunto puede considerarse como una dehesa de quejigo, con una orla de quejigo y encina. Ninguno de los pies existentes es productor de trufa a pesar de darse condiciones suficientes en cuanto a espesura, insolación, tipo de suelo, clima, etc. Las zonas de inoculación se ciñen al entorno inmediato de los árboles aislados.

Las experiencias comenzaron en marzo de 1997. El primer paso consistió en un subsolado lineal con tres rejones, a 80 cm de profundidad, en los $\frac{3}{4}$ del perímetro de los árboles aislados y en el 50% del perímetro de los árboles alineados. Un mes después, se realizó una zanja de 20-30 cm de profundidad y 30-40 cm de anchura con un tractor de ruedas provisto de arado bisurco, en 8 matas de *Quercus faginea* (Q-1 a Q-8) y 9 matas de *Quercus ilex* (E-1 a E-8 y E-20) en las que se realizó la inoculación *in situ*. El inóculo se preparó a partir de 2.8 Kg de *Tuber melanosporum* que se mezcló, una vez triturado, con vermiculita y agua. Se repartió un lecho de vermiculita y de diferentes dosis de inóculo de 10, 30 y 50 gr de trufa por metro lineal de zanja (tabla 1); por último, se incorporó hidrogel (ver tabla 1) y se dio un riego a manta con una cuba de 5.000 litros, (Figura 2).

Por otro lado, se realizaron trabajos previos de preparación de los sistemas radicales de otros pies de la misma parcela, trampas de raíces, con el fin de lograr una mayor concentración de raíces sobre las que se incorporaría el inóculo en la primavera de 1998. Este grupo de árboles también se subsoló en los $\frac{3}{4}$ del perímetro y se abrieron zanjas con arado de vertedera, donde se incorporó hidrogel o vermiculita o ambos productos a una profundidad de 20-30 cm, (ver tabla 2). Después de cerrar las zanjas, se aplicó un acolchado en parte de los pies (Q-32 y Q-34), consistente en manta de riego de material sintético de 80 cm de anchura y longitud similar a la zona inoculada, aproximadamente 7 m, que impedía una evaporación excesiva y evitaba la salida de malas hierbas. Para las trampas de raíces basadas en riego, se instaló un sencillo sistema de riego por goteo mediante tres depósitos de polietileno de 1000 l cada uno, intercomunicados y elevados sobre bloques de cemento. En total se regaron 5 árboles (Q-36, Q-40, Q-41 y Q-42), en los que se instalaron 8 puntos de goteo en la zona inmediata exterior al perímetro de la copa proyectada horizontalmente (zona de goteo de la copa). La distribución de agua se estableció mediante un programador de pilas con apertura y cierre automáticos de la válvula. Los riegos comenzaron el 1/07/97, con una frecuencia diaria de dos riegos de un caudal por gotero de 8 l/h (96 l/día por árbol). A partir del 30 de septiembre los riegos se redujeron a uno diario y el 10 de noviembre se suprimieron hasta la primavera/verano de 1998.

En octubre de 1997, se realizó un primer muestreo de micorrizas y, dado que, en estos primeros sondeos no se localizó una cantidad significativa de micorrizas de *Tuber melanosporum*, se realizó una nueva incorporación de material esporífero en primavera de 1998, en la mitad de los tramos de cada uno de los árboles ya inoculados en 1997, con dosis de inóculo de 80 g/m.

En la primavera de 1998, se inoculó el resto de ejemplares en los que se habían dispuesto trampas de raíces. Para ello se abrieron, con azada, los puntos de trampeo, extrayendo la tierra por capas, hasta que comenzaba a haber una mayor concentración de raíces y se tomaba contacto con el hidrogel o la vermiculita. El inóculo se incorporó en diferentes dosis (tabla 3). Durante esta primavera se llevó a cabo un segundo muestreo de micorrizas de las zonas inoculadas en 1997. A partir de ahí los muestreos se repitieron en la primavera de 1999 y en la de 2000.

Para evaluar la micorrización de las raíces de los diferentes árboles se tomaron muestras mediante dos sistemas diferentes. El primero sólo se utilizó en el muestreo de octubre de 1997 y consistió en extraer, con un sacabocados de volumen conocido, una porción de suelo para examinar las raíces existentes y referenciar luego los datos a volumen de tierra, este método se abandonó debido a lo costoso del trabajo de laboratorio y a la escasez de posibles micorrizas de trufa encontradas. En los siguientes muestreos se extrajeron raíces mediante la apertura de las zanjas de inoculación. Una vez abiertas se extraían porciones de raíz que contenían raicillas finas en abundancia. En el laboratorio se limpiaban las raíces por cuidadosos y sucesivos baños en agua, separando la tierra por decantaciones, el líquido se filtraba a través de un tamiz para no perder ninguna raicilla. Las muestras se someten a baños de ultrasonidos durante 10-15 minutos y se vuelven a decantar pasándolas por el tamiz, recogiendo las raíces y lavándolas por inmersión en agua limpia. Las raíces se observaron en lupa binocular y en microscopio óptico. La determinación de las micorrizas se realizó con las claves y descripciones de Meotto *et al* (1995), Zambonelli *et al* (1993), Saez & De Miguel (1995,) Etayo & De miguel (1998) y Agerer (1987-1998).

RESULTADOS

El primer muestreo se realizó seis meses después de la primera inoculación. Dado el escaso tiempo transcurrido se analizan fundamentalmente las muestras de E-20, donde la proporción de inóculo fue mayor. Este primer muestreo tiene un carácter previo y sus resultados no son comparables a los tres siguientes en los que se modificó la metodología.

En el muestreo mayo 1998, únicamente en 3 casos (E-3, Q-5 y E-20) se detecta presencia de micorrizas de *T. melanosporum*. En Abril de 1999 se vuelve a realizar otro muestreo en el que sólo se detectan micorrizas de *T. melanosporum* en Q-6.

En el último muestreo (tabla 4), destaca que la presencia de micorrizas de *T. melanosporum* se produce en 10 árboles (de los 17 muestreados). Además, en otras tres muestras se localizan micorrizas con manto en puzzle que comparten los caracteres de color y forma de *T. melanosporum*, pero no poseen las espínulas características, bien por carecer de ellas o por haberlas perdido en el proceso de muestreo. La proporción de micorrizas de *Cenococcum* disminuye con respecto a la que se encontró en el análisis de los dos años anteriores. Se identifican nuevas micorrizas de *T. aestivum* y *T. brumale* en muy pequeña proporción y de micorrizas de AD en una proporción mucho más importante. Otro dato a destacar es que no se encuentran micorrizas de manto blanco (posiblemente formadas por especies de género *Hebeloma*) que habían ido encontrándose en proporción alta en los muestreos anteriores.

CONCLUSIONES

Las técnicas de inoculación en campo necesitan aún numerosos ajustes, aunque de los sistemas utilizados, el más eficaz ha sido el de incorporar el inóculo trufero al suelo a la espera de que lleguen las raíces a la zona de suelo inoculada. La presencia de micorrizas de *Tuber melanosporum* no fue abundante en los primeros muestreos, pero sí, en el último realizado. En los análisis se ha comprobado la gran variabilidad micorrícica de los árboles inoculados y la dominancia de micorrizas de *Cenococcum*, micorrizas de manto blanco y de manto poligonal en los primeros análisis (que llegan a constituir casi el 45% del conjunto).

Existe un fondo de ápices radiculares sin micorrizar muy importante (del orden del 52% en el último análisis) que pueden haberse fomentado gracias a las prácticas culturales aplicadas y que al menos, teóricamente, permitiría una progresión de la inoculación.

Se ha conseguido establecer micorrizas de *Tuber melanosporum* cuya evolución futura puede ser excelente, dada la capacidad alelopática de la especie que le permite desplazar a otros hongos y eliminar gran parte de la vegetación del suelo.

AGRADECIMIENTOS

El Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM) está financiado por la Generalitat Valenciana y Bancaixa

BIBLIOGRAFÍA

- AGERER, R.; (1987-1998). *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn- Verlag. Munich.
- ETAYO, M & DE MIGUEL, A; (1998). *Estudio de las ectomicorrizas de una trufera cultivada situada en Oloriz, Navarra*. Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra. Serie Botánica 11: 55-114.
- FROCHOT, H; CHEVALIER, G; BARBOTIN, P; BEAUCAMP, F; GRILLOT, J. J; & MENU, C.P; (1999) *Avances sur la culture de la truffe de bourgogne*. 5 Congres International Science et la Culture de la Truffe. Aix en Provence. France
- HONRUBIA, M; TORRES, P; DIAZ, G; & CANO, A. (1992). *Manual para micorrizar plantas forestales*. Ministerio de Agricultura. ICONA.
- HONRUBIA, M; TORRES, P; & MORTE, A. (1993). *Biotecnología forestal: micorrización y micropropagación*. Universidad de Murcia, Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos.
- MEOTTO, F. & NOSENZO, C. (1995). Le micorrice di Tuber. L'Informatore Agrario 31/95: 41-45.
- PALAZÓN, C.; DELGADO, I.C. & BARRIUSO, J. (1999). *Estudio de la influencia de seis factores a tres niveles, sobre el proceso de micorrización de Quercus ilex por Tuber melanosporum y sobre la mortalidad producida en el mismo*. 5 Congres International Science et la Culture de la Truffe. Aix en Provence. France
- REYNA, S.; (1992). *La Trufa*. Mundi-Prensa. Madrid.
- REYNA, S.; (1999). *Aproximación a una Selvicultura trufera*. Tesis Doctoral. Valencia- Madrid
- REYNA, S.; RODRIGUEZ, B.; SAÍZ DE OMECAÑA, J.A.; ZAZO, J.; PÉREZ, R.; GALIANA, F. & DOMÍNGUEZ, J.A. (1999). *Producción de plantas micorrizadas de calidad: implantación, mantenimiento y mejora de rodales productores de trufa y otras setas*. Programa de investigación y desarrollo en relación con la cubierta vegetal: Reunión de Coordinación del Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. Castellón.
- REYNA, S; (2000). *Trufa, Truficultura y Selvicultura trufera*. Ediciones Mudi-Prensa. Madrid
- SAEZ, R. & DE MIGUEL, A.(1995). *Guia práctica de truficultura*. ITG Agrícola S.A. Universidad de Navarra.
- ZAMBONELLI, A. & SALOMONI, S. (1993). *Caraterizzazione anatomo-morfologica delle micorrice di Tuber ssp. Su Quercus pubescens Willd.*

TABLAS Y FIGURAS



Figura 1. Localización de la Parcela en la Provincia de Castellón.



Figura 2. Proceso de inoculación con apertura de zanja e incorporación de inóculo y aditivos.

Tabla 1
Inoculaciones 1997

Referencia	Especie	Hidrogel cc/m	Inóculo gr./m	Longitud m
Q-1	Quejigo	100 cc	10	5
Q-2	Quejigo	100 cc	10	5
Q-3	Quejigo	100 cc	30	5
Q-4	Quejigo	100 cc	30	5
Q-5	Quejigo	0	30	5
Q-6	Quejigo	0	30	5
Q-7	Quejigo	0	10	5
Q-8	Quejigo	0	10	5
E-1	Encina	100 cc	10	5
E-2	Encina	100 cc	30	5
E-3	Encina	100 cc	30	5
E-4	Encina	100 cc	10	5
E-5	Encina	0	30	5
E-6	Encina	0	30	5
E-7	Encina	0	10	5
E-8	Encina	0	10	5
E-20	Encina	200 cc	50	8
R	Encina	300 cc	200	1

Tabla 2.

Trampas de raíces. Preparación de sistemas radicales 1997, para inocular en 1998

Referencia	Preparación	Vermiculita	Hidrogel	Longitud
Tipo 1	Q-32	Acolchado	200 cc/m	20
	Q-34	Acolchado	200 cc/m	20
Tipo 2	Q-36	Riego por goteo		10
	Q-40	Riego por goteo		10
	Q-41	Riego por goteo		10
	Q-42	Riego por goteo		10

Tabla 3
Datos inoculación 1998

Referencia	Tipo preparación	Nº de puntos de inoculación por pie	Longitud inoculada	Dosis de inóculo (g/m) de trufa
Q-32	Acolchado	1	6	160
Q-34	Acolchado	1	6	80
Q-36	Riego por goteo	8	8	120
Q-40	Riego por goteo	8	8	120
Q-41	Riego por goteo	8	8	120
Q-42	Riego por goteo	8	8	120

Tabla 4.
Datos muestreo Junio 2000

Árbol	Inóculo Hidrogel	% de diferentes tipos de micorrizas en conteos sobre 150-200 ápices (aprox)										N° micor cont.
		Cenocc	Manto blanco	Manto poligo.	Manto puzzle	AD	T. aestiv.	T. brum	T. melan	Sin ident	Sin micor	
E-1	10+80/100	4.9	0.0	4.3	0.0	17.3	0.0	0.0	18.4	4.3	50.8	185
E-4	10+80/100	9.3	0.0	5.4	9.3	1.6	0.0	0.0	3.1	2.3	69.0	129
Q-1	10+80/100	1.1	0.0	3.9	0.0	62.9	0.0	0.0	11.2	0.6	20.2	178
Q-2	10+80/100	15.3	0.0	8.7	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0	6.1	62.2	196
E-2	30+80/100	1.1	0.0	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0	2.3	90.2	174
E-3	30+80/100	0.0	0.0	15.0	0.0	12.0	0.0	0.0	0.0	5.0	68.0	100
Q-3	30+80/100	3.8	0.0	0.0	10.5	35.5	0.0	0.0	0.0	0.0	50.4	238
Q-4	30+80/100	3.8	0.0	0.0	0.0	8.7	0.0	12.8	29.4	3.8	41.5	265
E-5	30+80	11.5	0.0	4.6	1.5	4.6	10.7	0.0	0.0	22.9	44.3	131
E-6	30+80	3.9	0.0	20.9	4.4	16.0	0.0	0.0	23.8	0.0	31.1	206
Q-5	30+80	28.9	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	6.2	0.0	63.6	225
Q-6	30+80	6.7	0.0	0.0	4.3	11.6	0.0	0.0	28.0	3.0	46.3	164
E-7	10+80	16.9	0.0	0.0	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	75.1	177
E-8	10+80	1.1	0.0	0.0	0.0	9.8	0.0	0.0	46.4	2.8	40.8	179
Q-7	10+80	23.7	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	14.2	0.0	53.8	169
Q-8	10+80	8.9	0.0	0.0	0.0	21.4	0.0	0.0	23.8	0.0	45.8	168
E-20	50+80	5.2	0.0	22.4	0.0	0.0	5.2	6.0	0.0	1.7	59.5	116
Medias		8.6	0.0	5.0	2.0	13.4	0.9	1.1	12.0	3.2	53.7	176.5