

MESA 2

ECTOMICORRIZAS EN DOS TRUFERAS ARTIFICIALES DE CASTELLON

José Alfonso Domínguez Núñez *, José Antonio Rodríguez Barreal * y
José Antonio Saiz de Omeñaca *

* U.D. Patología Forestal. Dpto. Silvopascicultura. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Av/ Ciudad Universitaria s/n. 28040, Madrid.
Tfo.: 91 336 71 03 E-mail: jadominguez@montes.upm.es

Resumen

Se han analizado dos plantaciones de *Quercus ilex* de cuatro años de edad, inoculadas artificialmente con el hongo de micorrización *Tuber melanosporum* (Trufa negra) y situadas en el termino municipal de El Toro (Castellón) en dos zonas de ecología similar, pero una de las parcelas en un antiguo suelo agrícola y la otra en un suelo forestal. Después de cuatro años, el hongo *Tuber melanosporum* ha permanecido y colonizado las raíces de la planta inoculada, aunque la presencia de hongos como *Tuber aestivum*, y *AD* podría suponer, en el futuro, una potencial competencia para *Tuber melanosporum*. El anterior uso de suelo de cada parcela podría haber definido los hongos de micorrización autóctonos, aunque no influyó en la colonización de *Tuber melanosporum*.

PALABRAS CLAVE

Quercus ilex, *Tuber melanosporum*, plantación forestal, ectomicorriza, identificación, trufera artificial.

INTRODUCCIÓN

El hongo de micorrización *Tuber melanosporum* (trufa negra) tiene una importancia indiscutible desde el punto de vista económico, pero también social y ecológico. La trufa es un complemento de rentas agrícolas especialmente en áreas de montaña donde es más difícil encontrar cultivos sustitutivos de los tradicionales. Su aprovechamiento permite compatibilizar esta actividad con otras labores agrícolas o ganaderas. El establecimiento de repoblaciones de quercíneas micorrizadas con *Tuber melanosporum* en hábitats del área mediterránea puede ayudar al mantenimiento y colonización del hongo *Tuber melanosporum* en el ecosistema del suelo, asegurar y mejorar las repoblaciones con quercíneas en el área mediterránea, y en el caso de hábitats truferos, producir los apreciados carpóforos.

Sin embargo, aún es escaso el conocimiento sobre la ecología y dinámica de las poblaciones de ectomicorrizas en ambiente mediterráneo, tanto procedentes de la micorrización natural (García, 1998), como artificial y su evolución en campo (MIGUEL DE & SÁEZ, 1997; ETAYO & MIGUEL DE, 1998; ÁGUEDA et al., 2001).

En el presente trabajo se estudia las ectomicorrizas a los cuatro años de edad de plantaciones experimentales de *Quercus ilex* inoculadas artificialmente con *Tuber melanosporum*, en dos localidades de ecología similar en la comunidad valenciana (España). Dichas parcelas pertenecen a un grupo de parcelas micorrizadas con *T. melanosporum* en la Comunidad Valenciana, cuyo seguimiento realizan los autores desde el año 1997 (RODRÍGUEZ et al., 1999; DOMÍNGUEZ, 2002; DOMÍNGUEZ et al., 2004a). Una de las parcelas se situó sobre un antiguo terreno agrícola, y la otra

dentro de un monte productor de trufa negra. El objetivo general de este estudio fue conocer el grado de adaptación de *Tuber melanosporum*, caracterizando las poblaciones de ectomicorrizas, y relacionando el grado de estabilidad y permanencia de *Tuber melanosporum*, según el uso del suelo.

MATERIAL Y METODOS

Producción de la planta

La planta de *Quercus ilex*, fue producida en las instalaciones de la ETSI Montes de Madrid en la primavera de 1997. Se inoculó parte de la planta con *Tuber melanosporum* y en noviembre se analizó la planta, realizando un control de la micorrización para comprobar el nivel de colonización con *Tuber melanosporum* y de otros hongos de micorrización competidores, obteniendo niveles adecuados para la implantación en campo, así como crecimientos significativamente mayores de la planta inoculada frente al control (DOMÍNGUEZ, 2002).

Descripción de los sitios, diseño experimental y plantaciones

Parcela El Toro

El área experimental de unos 1150 m² fue situado en el termino municipal de El Toro, provincia de Castellón, a 1000 m de altitud . El clima es mediterráneo, moderadamente cálido, seco, de inviernos frescos. Los suelos son calizos del tipo Xerochrept (USDA, 1985), de textura franco-arcilloso-arenosa. La precipitación media anual es de unos 600 mm, la precipitación media estival de 48 mm, la temperatura media anual de 13°C, y la evapotranspiración potencial de unos 775 mm/año. El terreno es prácticamente llano. Se estableció un diseño dirigido, con 3 repeticiones de 7 plantas control y 4 repeticiones de 7 plantas inoculadas con *Tuber melanosporum*, en filas separadas entre si por 4 m. y alternas por cada tratamiento. La plantación se realizó el 24-11-97. Previamente se realizó un laboreo superficial y a profundidad con bisurco y cultivador a 40 cm. Posteriormente se realizaron hoyos de 50x50x50 cm en un marco de plantación de 4x6 metros. Se establecieron unas 420 plantas/ha.

Parcela El Palancar Alto

El área experimental de unos 3500 m² se situó en una zona abierta del monte El Palancar en el término municipal de El Toro (Castellón, España), a 1000 m de altitud. El clima es mediterráneo, moderadamente cálido, seco, de inviernos frescos. El monte es tradicionalmente de producción trufera. Dominan las formaciones arbóreas de *Quercus ilex rotundifolia*, *Quercus faginea* y *Pinus nigra*, con matorral de *Brachypodium retusum*, *Genista scorpius* y *Quercus ilex rotunfifolia*. Suelos calizos del tipo Xerochrept (USDA, 1985) de textura arcillosa ligera. Precipitación media anual de 625 mm, precipitación media estival de 40 mm, temperatura media anual de 13 °C y ETP de 785 mm/año. Terreno prácticamente llano. Se estableció un diseño dirigido, con 3 repeticiones de 9 a 13 plantas control y 3 repeticiones de 10 a 13 plantas inoculadas, en filas separadas por 7 m y alternas por cada tratamiento. La plantación se realizó el día 25-11-97. Previamente se realizó laboreo previo superficial y a profundidad con bisurco a 40 cm y cultivador cruzado. Se realizaron hoyos de 50x50 x50 cm en un marco de plantación de 7x7 m. Se establecieron unas 200 plantas/ha.

Muestreo y Procedimientos de laboratorio

Cuatro años después de las plantaciones (diciembre 2001) se realizaron muestreos radicales en 4 plantas al azar por cada tratamiento y parcela. Cada muestreo, de tres replicas cada uno, se realizó mediante un sacabocados cilíndrico de 4 cm de diámetro y 10 cm de largo, tomando una muestra total de suelo de unos 377 cm³/planta; se muestreó entre los 10-20 cm de profundidad en la periferia de la proyección de la copa de la planta. Cada muestra se guardó en bolsa de polietileno cerrada y de almacenó en cámara a 4°C hasta su posterior análisis en laboratorio. Se caracterizaron los morfotipos

de ectomicorrizas presentes, tratando de identificarlos siguiendo las directrices de diversos autores (AGERER, 1987-98; GOODMAN et al., 1996-2000; INGLEBY et al., 1990; ROMÁN DE & MIGUEL DE, 2000). Se realizó el conteo del número total de ápices micorrizados y no micorrizados de cada muestra de suelo, se calcularon las tasas de micorrización de *Tuber melanosporum* y del resto de hongos ectomicorrícicos. La tasa de micorrización de *Tuber melanosporum* se expresó como número total de ápices micorrizados de *Tuber melanosporum* (T) respecto al número total de ápices no micorrizados (N) + número de ápices micorrizados con hongos contaminantes (C) + T, es decir, $\%T = 100 * (T / (N + C + T))$. La tasa de micorrización de hongos contaminantes se calculó de la misma manera. Se trataron de identificar los hongos de micorrización descritos. Además se estableció el parámetro "Riqueza de Ectomicorrizas" (RE) definido por el número de morfotipos de ectomicorrizas por planta.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *Statgraphics plus*. Se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial para definir interacciones entre factores. Se calcularon las medias de los parámetros propuestos y un test de comparación de medias por Scheffé o Tukey, para un nivel de confianza del 0,1, 0,05 y 0,01 %. En caso de varianzas no homogéneas se aplicó test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Del muestreo total de raíces se caracterizaron 6 morfotipos, dos en Palancar y 4 en el Toro, identificando tres de ellos como AD (Anglé Droit; GIRAUD, 1988), *Telephora terrestris* y *Tuber aestivum*. (DOMÍNGUEZ et al., 2004b)

Después de 4 años desde la implantación, el análisis de ectomicorrizas muestreadas en diciembre de 2001 en las parcelas de *El Toro* y *Palancar* reflejó los resultados representados en las Fig. 15., y Tablas 1, 2 y 3. No se produjeron interacciones entre el factor inoculación y el factor parcela. No parece que el origen de la parcela influyera en el número ni en la riqueza de ápices micorrizados, pero el factor inoculación influyó de forma significativa en el número de ápices micorrizados de *Tuber melanosporum* (obviamente) y en el de otros hongos ectomicorrícicos.

En la parcela de *El Toro* se encontró una media total de 125 y 68 ápices micorrizados en planta control e inoculada respectivamente (en 377 cm³ de suelo), y no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El número medio de ápices micorrizados de *Tuber melanosporum* en planta inoculada fue de 64. El número medio de ápices de otros hongos de micorrización fue de 125 y 4 en planta control e inoculada respectivamente, y se produjeron diferencias significativas entre tratamientos. Se obtuvieron tasas de micorrización (Fig. 15) del 96 % de *Tuber melanosporum* y 4 % de Q1 en planta inoculada. En planta control las medias fueron del 51 % en AD, 24 % en Q1, 15 % en Q3 y 10 % en Q2.

En la parcela de *El Palancar*, se obtuvo una media total de 49 y 132 ápices micorrizados por planta control e inoculada respectivamente (en 377 cm³ de suelo), y no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El número medio de ápices micorrizados de *Tuber melanosporum* en planta inoculada fue de 130. El número medio de ápices micorrizados de otros hongos de micorrización fue de 49 y 2 en planta control e inoculada, respectivamente, y se produjeron diferencias significativas entre tratamientos. Las tasas de micorrización (Fig. 15) fueron del 99 % de *Tuber melanosporum* y 1 % de *Telephora terrestris* en planta inoculada. En planta control fueron 46 % de *Tuber melanosporum*, 32 % de *Tuber aestivum* y 23 % de *Telephora terrestris*.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, las dos parcelas corresponden a dos zonas con ecología muy parecida, si bien una de las parcelas correspondía a un monte natural y la otra había sido explotada anteriormente con cultivos agrícolas, y por tanto el suelo tenía un historial diferente. En nuestros ensayos, y aunque los suelos de las parcelas de *El Toro* y *Palancar* tenían, previamente a la plantación (DOMÍNGUEZ et al., 2004a), unas relaciones carbono/nitrógeno inferiores a los valores normales en suelos truferos según la bibliografía tradicional (REYNA, 1999), este aspecto no parece haber influido en la permanencia de la simbiosis con *Tuber melanosporum*, según los resultados de los análisis de micorrizas.

En el análisis de ectomicorrizas, y según el contraste realizado, el origen de la parcela (antiguo cultivo agrícola en *El Toro*, y monte trufero en *El Palancar*), no parece haber influido en la cantidad y riqueza de ectomicorrizas, aunque los hongos de micorrización encontrados fueron totalmente diferentes entre ambas parcelas, a excepción claro está, de *Tuber melanosporum*. Por otra parte, parece que la inoculación influyó de forma significativa en una disminución de la cantidad de otras ectomicorrizas diferentes de *Tuber melanosporum* (es decir, autóctonas del lugar o procedentes de vivero), por una posible mayor competencia inicial de *T. melanosporum* (al menos durante los primeros 4 años desde la implantación). El dominio de *T. melanosporum* en la planta inoculada fue muy claro. No se produjeron desplazamientos graves por otros hongos del ecosistema del suelo, aunque hongos identificados como *Tuber aestivum*, y *AD* podrían ser en el futuro importantes competidores de *Tuber melanosporum* (DI MASSIMO et al., 1996; ETAYO & DE MIGUEL, 1998). Aparentemente, la presencia inicial en vivero de hongos contaminantes como *Telephora terrestris*, *Sphaerospora brunnea* o *Laccaria laccata* (DOMÍNGUEZ, 2002) fue sustituida por otros hongos del ecosistema más competitivos que ellos, excepto en el caso de *Telephora terrestris*, cuya presencia podría tener origen en vivero. De todas formas, la presencia de *Telephora terrestris* en planta inoculada fue casi despreciable a los 4 años de la implantación.

Como se observa del análisis de micorrizas, una menor manifestación de la actividad de *Tuber melanosporum* en *Palancar* respecto de *El Toro*, tanto en la supervivencia como en el crecimiento (DOMÍNGUEZ et al., 2004a) no ha tenido aparentemente una relación directa con la tasa de micorrización de este hongo, que en los dos casos ha sido alta, aunque el número de morfotipos de otros hongos encontrados fue levemente (aunque no de forma significativa) mayor en *El Toro* que en *El Palancar*. Según los resultados obtenidos, podría ocurrir que en un suelo forestal (*Palancar*), aparentemente menos alterado que un antiguo cultivo agrícola (*Toro*), la aportación de la micorrización autóctona al crecimiento de la planta (DOMÍNGUEZ et al., 2004a) haya sido similar a la de la micorrización controlada con *Tuber melanosporum*, mientras que la micorrización autóctona en un suelo más alterado (*Toro*) pudiera aportar menor crecimiento a la planta que *Tuber melanosporum* (DOMÍNGUEZ et al., 2004a). También pudiera ocurrir que la colonización con hongos autóctonos en la planta control requiriera de un tiempo durante el cual, la planta previamente inoculada dispusiera de una mayor ventaja para su instalación y crecimiento.

En definitiva, del análisis de ectomicorrizas efectuado en las parcelas de *El Toro* y *Palancar* se observa que el hongo inoculado *Tuber melanosporum* permaneció y se estabilizó sobre la planta huésped desde que se realizó su implantación hace 4 años.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló gracias a los proyectos, mediante convenios entre la Universidad Politécnica de Madrid y la Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo C.E.A.M. y financiados por la Consellería de Medio Ambiente de la Comunidad Valenciana, denominados "Producción de plantas micorrizadas de calidad; implantación, mantenimiento y mejora de montes productores de trufa y otras setas" (1996-1999) y "Seguimiento de parcelas experimentales de planta forestal micorrizada" (2001-2004), dentro del Programa de Investigación y Desarrollo en Relación con la Restauración de la Cubierta Vegetal.

Este trabajo más ampliado se publicará en el Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 31 (DOMÍNGUEZ et al., 2004b).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGERER R. (1987-1998) "Colour Atlas of Ectomycorrhizae". Ed. Einhorn-Verlay (Munich).
- ÁGUEDA, B., FERNÁNDEZ, M. & MIGUEL, A.M. DE, 2001. Ectomicorrizas presentes en la plantación trufera " Los Quejigares" (Soria). Actas del III Congreso Forestal Español. Granada.
- DI MASSIMO, G., GARCÍA-MONTERO, L.G., MANJÓN, J.L. & DÍEZ, J., 1996. Hongos micorrícicos competidores de *Tuber melanosporum* Vitt. presentes en ecosistemas naturales y viveros del centro de España. Boletín Sociedad Micológica de Madrid, 21: 189-199.
- DOMÍNGUEZ, J.A., 2002. Aportaciones de la micorrización artificial con trufa negra en planta forestal. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis Doctoral. 402 pp.
- DOMÍNGUEZ, J.A., RODRÍGUEZ, J.A. Y SAIZ DE OMEÑACA, J.A., 2004a. Parcelas experimentales de *Quercus ilex* micorrizado con *Tuber melanosporum* en la Comunidad Valenciana. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 30 (1). 113-124.
- DOMÍNGUEZ, J.A., RODRÍGUEZ, J.A. Y SAIZ DE OMEÑACA, J.A., 2004b. Ectomicorrizas en dos plantaciones trufieras de encina en Castellon. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 31 (Pendiente de publicación).
- ETAYO, M.L., & DE MIGUEL, A., 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra). Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 11:55-114.
- GARCÍA, G., 1998. Caracterización y aspectos dinámicos del componente ectomicorrícico de los ecosistemas forestales mediterráneos. Tesis Doctoral. Dpto. de Biología Vegetal, Universidad de Murcia. 641 pp.
- GIRAUD, M., 1988. Prélèvement et analyse de mycorhizes. Pp. 49-63. In: CTIFL (ed.), *La truffe*, FNPT 10, Congrès de la trufficulture, Saintes, 27-28 novembre, 1987.
- GOODMAN, D.M., DURALL, D.M., TROFYMOW, J.A. & BERCH, S.M., 1996-2000. A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae. Mycologue Publications. British Columbia.
- INGLEBY, K., MASON, P.A., LAST, F.T. & FLEMING, L.V., 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE. Research publication nº5.
- MIGUEL, A.M. DE & SÁEZ, R., 1997. Análisis de micorrizas en trufieras cultivadas de Navarra. Publ. Biol. Univ. Navarra, Ser. Bot. 10: 11-18.
- REYNA, S., 1999. Aproximación a una Selvicultura Trufera. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis Doctoral. 325 pp.
- RODRÍGUEZ J.A., REYNA , S., DOMÍNGUEZ , J.A., SAÍZ DE OMEÑACA, J.A., ZAZO, J., PÉREZ, R., GALIANA, F., 1999. Producción de Plantas Micorrizadas de Calidad; Implantación, Mantenimiento y Mejora de Rodales Productores de Trufa y Otras Setas. Reunión final de Coordinación del Programa de Investigación y desarrollo en relación con la restauración de la Cubierta Vegetal. C.E.A.M. (Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo). Castellón
- ROMÁN, M. DE & MIGUEL, A.M. DE, 2000. Identificación y descripción de las ectomicorrizas de *Quercus ilex* L. subsp. Ballota (Desf.) Samp. En una zona quemada y una zona sin alterar del carrascal de Nazar (Navarra). Publicaciones de Botánica, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 13: 1-42.
- USDA, 1985. Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys. Washington.

Tabla 1. Análisis ANOVA. Cuantificación de ectomicorrizas

Factor	Total ectomicorrizas	<i>Tuber melanosporum</i>	Otras ectomicorrizas	Riqueza ectomicorrícica
Inoculación	NS	***	**	NS
Parcela	NS	NS	NS	NS
Interacción	NS	NS	NS	NS

NS, *, ** y *** indican diferencias no significativas, o significativas con $p < 0,1$, $0,05$ y $0,01$, respectivamente.

Tabla 2. Análisis de ectomicorrizas en la parcela de El Toro: N° de ectomicorrizas por muestra de suelo (377 cm³)

<i>El Toro</i>	Total ectomicorrizas	<i>Tuber melanosporum</i>	Otras ectomicorrizas	Riqueza ectomicorrícica
Control	125 (± 67) a	0 b	125 (± 67) a	1,5 (± 0,3) a
Inoculada	68 (± 26) a	64 (± 24) a	4,0 (± 4) b	1,5 (± 0,3) a

Valores entre paréntesis reflejan el error estándar. N=4

Valores de una misma columna con diferente letra, difieren significativamente ($p < 0,05$) según test de Tukey.

Tabla 3. Análisis de ectomicorrizas en la parcela de Palancar: N° de ectomicorrizas por muestra de suelo (377 cm³)

<i>Palancar</i>	Total ectomicorrizas	<i>Tuber melanosporum</i>	Otras ectomicorrizas	Riqueza ectomicorrícica
Control	49 (± 17) a	0 b	49 (± 17) a	1,5 (± 0,3) a
Inoculada	132 (± 48) a	130 (± 47) a	2 (± 2) b	1,25 (± 0,2) a

Valores entre paréntesis reflejan el error estándar. N=4

Valores de una misma columna con diferente letra, difieren significativamente ($p < 0,05$) según test de Tukey.

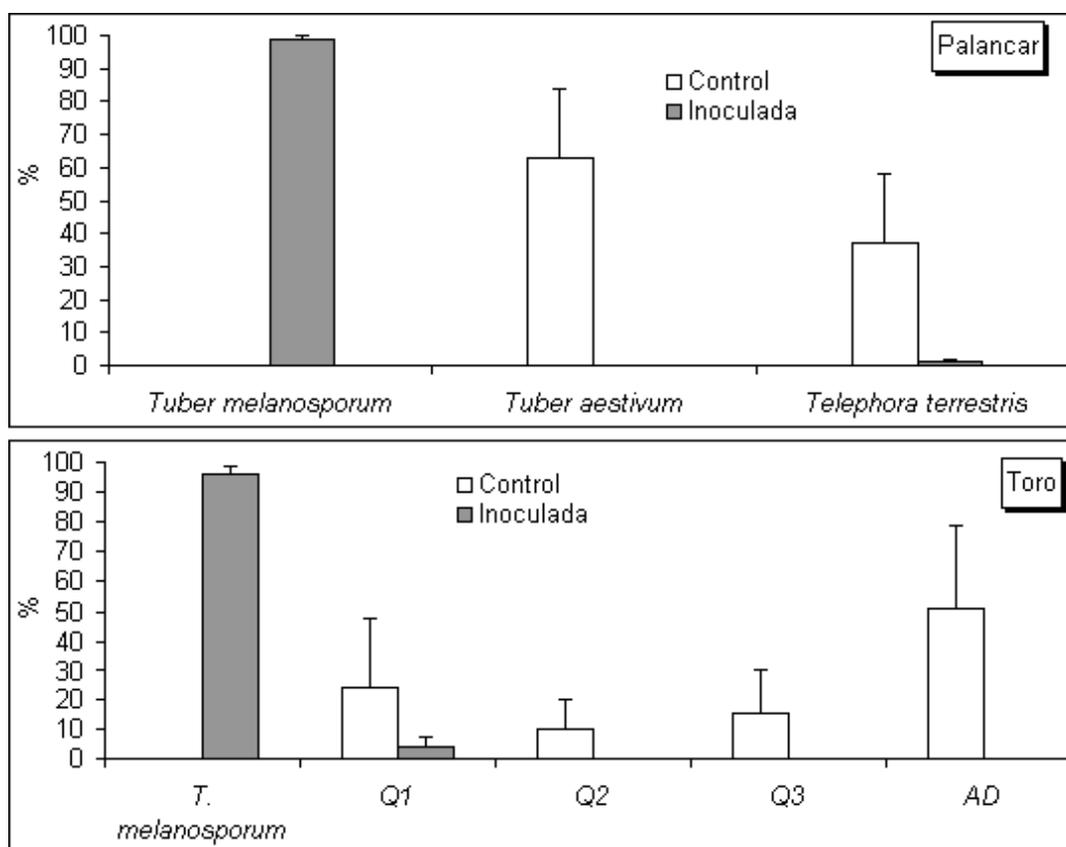


FIG. 16. Cuantificación de ectomicorrizas en las parcelas de El Toro y Palancar
Las barras representan el error estándar. N=4

Fig. 15. Cuantificación de ectomicorrizas en las parcelas de *El Toro* y *El Palancar*.
Las barras representan el error estándar. N=4