

ESTUDIO DE LA CALIDAD ESPORAL DE LOS CARPÓFOROS DE *Tuber melanosporum* Vitt. SEGÚN SU PROCEDENCIA Y SU INFLUENCIA POSTERIOR EN LA MICORRIZACIÓN ARTIFICIAL DE *Quercus ilex* L.

INCAUSA Ana Isabel (1); PALAZÓN Carlos (2); BARRIUSO Juan (3)

(1) TECNOSPORUM S.C., C/ Condes de Aragón 10, 3ºB, 50009 Zaragoza.

E-mail: anaisincausa@terra.com

(2) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón. Apartado 727. 50080 Zaragoza, España.

E-mail: cpalazon@aragon.es

(3) Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Ctra. Cuarte s/n. 22071 Huesca,

E-mail: barriuso@unizar.es

Palabras clave: Ectomicorrizas, trufa negra, truficultura

Resumen

El presente trabajo estudia la posible influencia de factores como la procedencia geográfica de las trufas, la calidad esporal del inóculo fúngico, el empleo de dos tipos de sustrato diferentes y el secado de carpóforos a temperatura ambiente o en estufa a 40°-45°C, en el porcentaje de micorrización obtenido en plantas inoculadas. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos revelan que los factores estudiados no influyen en la micorrización, obteniendo en todos los casos unos niveles en cuanto a porcentajes que superan los mínimos aceptables establecidos en un 30%. La mayor o menor calidad esporal de los carpóforos de trufa depende de su estado de madurez de manera directamente proporcional. La afinidad geográfica entre el inóculo fúngico y la planta hospedante es importante, aunque en este caso no es determinante para obtener un porcentaje de micorrización óptimo. La calidad esporal no parece influir en la evolución en el tiempo del porcentaje de micorrización, ni en la precocidad de la instalación de la simbiosis.

INTRODUCCIÓN

Para la truficultura el desarrollo de métodos y técnicas de inoculación controlada comienza en los años sesenta (PALENZONA, 1969) hasta llegar con el tiempo a sistemas de producción de planta micorrizada con trufa negra de manera comercial. Desde entonces la investigación y el desarrollo de la truficultura han avanzado notablemente, sobre todo en Francia e Italia, con centros específicos de trabajo y sobre todo un sector privado que fomenta estas líneas de trabajo (REYNA, 2000).

La investigación agraria ha contribuido sin duda a sentar las bases del relanzamiento de la truficultura, aun así, la instalación de truferas cultivadas está atravesando dificultades para concretar las ofertas potenciales que representa, a pesar de los avances realizados en cuanto a producción en vivero de planta micorrizada. Las explicaciones a este hecho son diversas: la incidencia del clima, la heterogeneidad del material vegetal, el papel de los hongos competidores micorrícicos... Lo que sí es cierto es que, comparativamente a otras especies fúngicas, el ciclo biológico de la trufa negra es muy complejo y se presta mal a su estudio experimental (OLIVIER, 1997).

En el aspecto fisiológico, en concreto, se viene observando una serie de anomalías en cuanto a la organización y la maduración de los ascocarpos de *Tuber melanosporum* debido, principalmente, a la presencia, cada vez mayor, de ascas vacías (sin esporas) en los cuerpos fructíferos de la trufa. Estas observaciones, realizadas desde hace varios inviernos, se traducen en carpóforos de gleba blanca (o muy clara) y menos aromática.

Otro aspecto importante a considerar reside en la gran variabilidad de las cualidades y calidades organolépticas de las trufas, entre ellas el apreciado gusto y aroma, sin que pueda precisarse la relación causal con el material vegetal y su entorno. Este tipo de variaciones se suelen atribuir a la combinación de efectos genéticos y condiciones ambientales. En el caso de la trufa negra la

variabilidad genética es muy pequeña, rasgo que comparte con la trufa blanca, pero no con el resto de las especies del género *Tuber* (GANDEBOEUF *et al.*, 1997; BERTAULT *et al.*, 1998). Sin embargo, no se puede garantizar una calidad estándar en función de la procedencia (trufera natural o cultivada, región,...) debido a la falta de conocimiento actual de la influencia de parámetros del entorno sobre la composición del aroma de la trufa. Si el efecto del suelo parece no ser más que un efecto más, por el contrario, la influencia de las condiciones climáticas parece preponderante. En lo que concierne a las técnicas culturales, su aporte no ha sido hoy en día científicamente evaluado. Parece, por tanto, que el halo de misterio que rodea a la trufa no es sólo una leyenda, al menos de momento.

Los objetivos de este trabajo son: determinar la calidad esporal entendida como la proporción de ascosporas viables respecto al total de las mismas, estudiar la distribución de la calidad esporal dentro de la geometría y el volumen de los carpóforos de trufa, evaluar la influencia de algunos factores tales como la procedencia de las trufas, su calidad esporal, el tratamiento de secado y el empleo de sustratos diferentes en la micorrización artificial de plantas de *Quercus ilex* L. y finalmente estudiar la evolución de dicha micorrización en el tiempo, en función de la calidad esporal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal: El material vegetal base del presente trabajo son las plantas procedentes de bellotas de *Quercus ilex* L. obtenidas de una encina milenaria de Lecina (Huesca) y recogidas durante el mes de noviembre, en plena madurez. La zona de recolección se caracteriza como trufera.

Material fúngico: Las trufas objeto de este proyecto tienen distinta procedencia: Soria, Granada, Navarra, Sarrión (Teruel), Huesca, Graus (Huesca) y Teruel. Por su distribución geográfica se puede decir que representan el conjunto de las zonas de producción trufera en España. Su característica general es la de coincidir en tiempo, madurez, aroma y demás cualidades organolépticas, entendiéndose todas ellas bien situadas en el papel de trufas maduras.

Substratos:

SUBSTRATO SIA3: 100% de tierra de la parcela de encinas micorrizadas del SIA
con pH = 8,5

SUBSTRATO 2001A: Tierra de Peñaflor (40% en peso) + Tierra de SIA3 (40% en peso) +
Humin Substrat © (15% en peso) + Vermiculita nº 3 (5% en peso), con pH =
8

SUBSTRATO 2001: Tierra de Peñaflor (80% en peso) + Humin Substrat © (15% en
peso) + Vermiculita nº 3 (5% en peso), con pH = 8,2

Metodología experimental

Distribución espacial de la calidad esporal dentro de la geometría y el volumen del carpóforo

Se han tomado datos sobre las características morfológicas de cada uno de los carpóforos de trufa y otros como procedencia, tipo de trufera y fecha de recolección. Posteriormente se ha llevado a cabo la limpieza mediante cepillado bajo el chorro de agua y desinfección con etanol de 96° a la llama durante unos segundos.

La toma de muestras de cada uno de los carpóforos se ha realizado en puntos estratégicos ("Figura 1A"). Esta posición viene determinada con las letras C1 (posición central), P1, P2, P3, P4, P5, P6, (diferentes posiciones distales o en la periferia). Por tanto se han tomado 7 muestras por cada ejemplar de trufa. No se han encontrado antecedentes bibliográficos en cuanto a este tipo de ensayo. Para preparar una muestra se ha tomado, con ayuda de la lanceta, una pequeña cantidad equivalente a 0,05 g de la zona correspondiente y se ha colocado en un porta con unas gotas de agua. Se ha observado al microscopio y se ha determinado el número de ascas maduras o viables (de color oscuro) en relación con las inmaduras o inviables (de color claro) sobre un número aproximado de 100 ("Figura 1B"). El cálculo final de la calidad esporal ha sido definido por la ecuación:

$$\text{CALIDAD ESPORAL (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ ascas viables} / \text{n}^\circ \text{ ascas totales}) \times 100$$

Influencia de la procedencia del inóculo fúngico sobre la calidad esporal

Consiste en determinar la calidad esporal de las trufas de cada uno de los lotes que se corresponderá teóricamente a una mayor proporción de ascosporas maduras o viables

Se han pesado y rallado las trufas, cada lote por separado. Se han introducido en la estufa donde se han mantenido durante una semana a 45°-50°C. En los lotes denominados HUESCA, GRAUS y TERUEL el material fresco se divide en dos partes de peso similar para realizar dos secados diferentes: uno a la estufa y otro al aire libre a temperatura ambiente (25°-30°C aproximadamente).

Se ha pesado la trufa seca y se ha calculado la relación entre el peso fresco y el peso seco para cada uno de los lotes. Se han introducido las virutas de trufa en un molinillo de bolas previamente desinfectado con etanol de 96° y seco, para la obtención de polvo de trufa que se ha almacenado en recipientes herméticos y etiquetados.

Se ha realizado la observación al microscopio de las muestras de trufa seca diluidas en agua destilada usando para ello una cámara de Neubauer (hematímetro). El conteo se ha realizado en números absolutos.

$$\text{CALIDAD ESPORAL (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ ascas viables} / \text{n}^\circ \text{ ascas})$$

Posteriormente se ha realizado la inoculación por espolvoreo con talco descrita por CARTIÉ *et al.* (1999). Como método para el control del estado de micorrización se ha utilizado el descrito por PALAZÓN *et al.* (1999).

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los datos y resultados obtenidos en los diferentes ensayos se ha realizado con el programa informático SYSTAT 7.0 para WINDOWS. Mediante el análisis de varianza ANOVA se han determinado las posibles diferencias, con un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de la calidad esporal dentro de la geometría y el volumen del carpóforo

Se ha realizado el análisis estadístico de varianza ANOVA de los datos del ensayo por lotes u orígenes. En todos los casos el análisis ha revelado que no existen diferencias significativas entre la proporción de ascas maduras respecto al total de la zona centro y de la zona de la periferia en el conjunto de las trufas de cada uno de los lotes. De esta manera se puede decir que en todos los lotes aparece una distribución de la madurez homogénea dentro de la geometría y el volumen del conjunto de los carpóforos. Estos resultados se deben fundamentalmente, a la tardía fecha de recolección de los carpóforos.

Mediante la representación de los datos (Figura 2), se ha observado como la calidad esporal es mayor en la zona centro de la trufa que en la periferia en la totalidad de los casos, lo que induce a pensar, coincidiendo con CALLOT (1999), en que la maduración de las ascas y ascosporas dentro del carpóforo se realiza desde el interior de la gleba hacia el exterior, ya que la ascosporigénesis se inicia en la fase de desarrollo del primordio y continua durante el desarrollo y engrosamiento del carpóforo de forma radial hacia la periferia del mismo.

Influencia de la procedencia del inóculo fúngico sobre la calidad esporal.

Los resultados finales de calidad esporal han oscilado para el conjunto de los lotes entre un máximo de 74.2 y un mínimo de 53.2 (Tabla 1). En el caso de los lotes que han recibido distinto tratamiento en el proceso de secado, no se obtuvieron diferencias significativas.

Influencia de diversos factores sobre la micorrización de las plantas.

En todos los casos se ha superado el mínimo porcentaje de micorrización recomendado por el método de control descrito por PALAZÓN *et al.* (1999), el cual se establece en un 30% (Tabla 2). El análisis estadístico de los datos de micorrización obtenidos en relación a la calidad esporal, el origen del inóculo trufero, el tipo de substrato y el tipo de secado mostró la ausencia de diferencias

significativas en todos los factores analizados (Tabla 3).

Ante la ausencia de diferencias significativas, se representa gráficamente mediante barras la relación entre la calidad esporal de los diferentes lotes y la tasa de micorrización obtenida, (Figura 3). Teniendo en cuenta que en principio, cuanto mayor sea la calidad esporal del inóculo más probabilidades existirán de obtener niveles superiores de micorrización, destacan los datos de GRAUS, con una calidad esporal baja-media (60,7 y 60,9) respecto al resto de los lotes, y un porcentaje de micorrización muy elevado (61,3 y 57,2) y el lote denominado GRANADA cuya calidad esporal se encuentra en el grupo de las cinco más elevadas (66,8) y sin embargo, los resultados tras la inoculación, representan los valores más bajos, tanto con el substrato SIA3 (51,3) como con el substrato 2001A (50,5).

El origen del inóculo fúngico tampoco parece influir en la micorrización, puesto que no aparecen diferencias significativas entre los lotes estudiados. A pesar de ello, cabría hacer mención a la lectura de la Figura 3, haciendo referencia a los datos más destacados del mismo: GRAUS y GRANADA. Ambos puntos se caracterizan por estar a la menor y mayor distancia, respectivamente, del punto geográfico de origen de la bellota de la cual procede el material vegetal utilizado para la inoculación artificial. El estado de micorrización final obtenido en estos casos puede tener alguna explicación si recordamos que para obtener el mayor éxito en la asociación micorrízica es importante que exista cierta afinidad geográfica entre la procedencia del inóculo y la del material vegetal (PALAZÓN *et al.*, 2000).

Estudio de la evolución de la tasa de micorrización según la calidad esporal y su posible efecto sobre la precocidad en la instalación de la simbiosis.

La toma de muestras y observación al microscopio de plantas micorrizadas se ha realizado con un intervalo de 2 semanas en todos los casos, obteniendo finalmente un porcentaje de micorrización dentro de los mínimos aceptables que lo fijan en un 30% (PALAZÓN *et al.*, 1999). Debido a la progresión observada en la tasa de micorrización en el tiempo (Figura 4) se ha realizado un análisis estadístico (ANOVA) que determina que existen diferencias altamente significativas entre las fechas de control establecidas. Se ha llevado a cabo un nuevo análisis estadístico (ANOVA) de los datos, esta vez agrupados por fechas, y tomando como fuente de variación la calidad esporal (ver TABLA 6). Los resultados obtenidos revelan diferencias significativas únicamente en dos fechas de control: 7/08/01 y 16/10/01.

Aunque existan diferencias significativas en la fecha de control del 7/08/10, no parece ser importante a tenor de la evolución posterior en las siguientes semanas. Sin embargo, los datos obtenidos en la última de las fechas de control efectuadas puede llevar a la conclusión de que con una calidad esporal baja, dentro de unos límites (entre 0-30%), se pueden obtener unos niveles de micorrización más altos. Para asegurar algo así sería aconsejable realizar un control más dilatado en el tiempo, ya que en la anterior experiencia no se pudo detectar la influencia de la calidad esporal sobre el grado de micorrización.

La calidad esporal no parece tener influencia en la precocidad de la instalación de la simbiosis. Los resultados obtenidos sobre la evolución de los porcentajes, parecen confirmarlo, ya que aunque al comienzo los porcentajes sean mayores en los lotes de alta calidad esporal, la tendencia se invierte con el paso del tiempo para posteriormente igualarse en el primer control de septiembre, pasados cinco meses desde la inoculación.

CONCLUSIONES

No se han observado diferencias significativas en cuanto a la distribución espacial de la calidad esporal en el conjunto de los carpóforos estudiados debido, fundamentalmente, a la tardía fecha de recolección de los mismos. Sin embargo, se aprecia una mayor concentración de ascosporas maduras en el centro de las trufas respecto a la periferia de las mismas cuando el estado de madurez no es pleno, diferencia que se va disipando a medida que se aumenta el grado de maduración de los carpóforos. La presencia de gran cantidad de ascosporas en formación es un indicativo de que la maduración óptima está aún por llegar.

El estado de micorrización final obtenido en las encinas inoculadas con trufas de distinto origen no difiere significativamente en ninguno de los casos. Sin embargo, destacan las diferencias obtenidas respecto a la procedencia de Granada y de Graus, lo que corrobora la teoría de la afinidad

geográfica entre el material vegetal y el inóculo fúngico.

El empleo del sustrato SIA3, procedente de una trufa cultivada, o del sustrato 2001A no ha resultado ser determinante en el porcentaje de micorrización obtenido.

Para la elaboración del inóculo micorrízico de *Tuber melanosporum* la aplicación de un tratamiento de secado a la estufa a 40°-45° o a temperatura ambiente a 20°-25°C tampoco influye en los porcentajes de micorrización obtenidos.

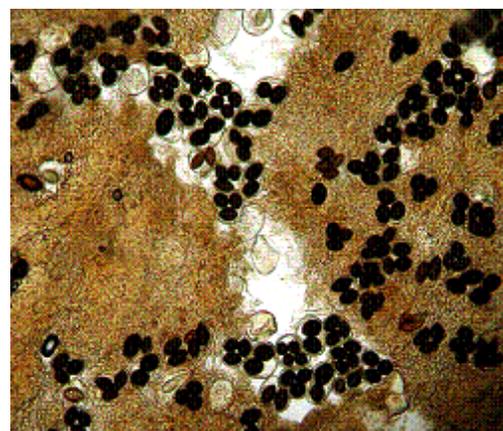
La calidad esporal no influye en los porcentajes de micorrización de la planta, al menos, en el período comprendido entre el tercero y el sexto mes posterior a la inoculación. Sin embargo, sería aconsejable prorrogar esos plazos de estudio ya que en la última fecha de control de la micorrización sí se observa una relación entre menor calidad esporal y mayor tasa de micorrización obtenida, lo que contradice en parte los resultados anteriores.

La influencia de la calidad esporal en la precocidad de la instalación micorrízica no parece clara ya que aunque la tendencia inicial indica una mayor micorrización cuanto mayor es la proporción de ascosporas maduras, en las últimas fechas la tendencia se invierte, no pudiendo por tanto sacar una conclusión válida.

BIBLIOGRAFÍA

- BERTAULT, G.; RAYMOND, M., BERTHOMIEU, A., CALLOT, G. y FERNÁNDEZ, D., 1998. Trifling variation in truffles. *Nature*, 394: 734.
- CALLOT, G. 1999. "La truffe, la terre, la vie". INRA Ed. 1999.
- CARTIÉ, G.; PALAZÓN, C.; DELGADO, I. y BARRIUSO, J. 1999. "Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt., y en la supervivencia de las plantas". 5º Congreso internacional science et la culture de la truffe. Aix-en-Provence 4-5-6/3/1999.
- GANDEBOEUF, D., DUPRÉ, C.; ROECKEL-DREVET, P.; NICOLÁS, P. y CHEVALIER, G., 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can. J. Bot.*, 75: 36-45.
- OLIVIER, J.M., 1997. Biologie de la truffe et actualité de la trufficulture. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 83 (2): 47-54
- PALAZÓN, C.; CARTIÉ, G.; DELGADO, I.; BARRIUSO, J. y ESTEBAN, H. 1999. "Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* spp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt., para la obtención, en España, de la etiqueta de certificación". 5º Congreso internacional de science et la culture de la truffe. Aix-en-Provence. 4-5-6/3/1999.
- PALAZÓN, C.; DELGADO, I.; BARRIUSO, J.; URDÍROZ, A. y VILAS, J. 2000. "Plantaciones trufas: instalación, labores culturales, seguimiento y estudio económico". Jornadas de trufficultura. Viver-El Toro (Castellón) 26-27-28/10/2000.
- PALENZONA, M. 1969. Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Corylus avellana*. *Allionia*, 15: 121-131.
- REYNA, S. 2000. "Trufa, trufficultura y silvicultura trufera". Ediciones Mundi-Prensa. Madrid 2000.

Figura 1: A-Distribución espacial de la toma de muestras en cada uno de los carpóforos. B- Vista al microscopio de ascas y ascosporas en su mayoría maduras.



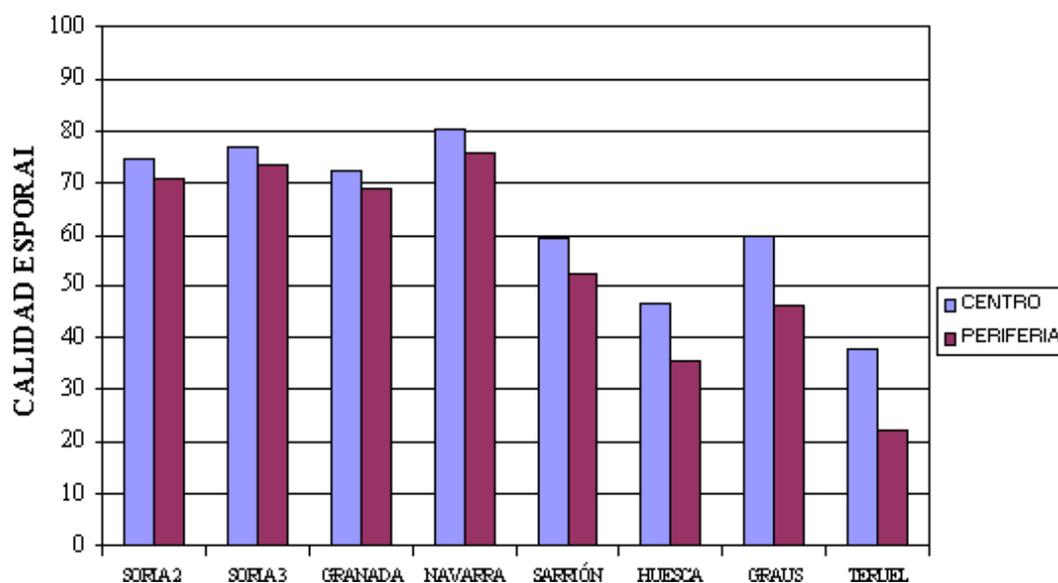


Figura 2: Distribución espacial de la calidad esporal según los lotes

Tabla 1: Calidad esporal de cada uno de los lotes.

LOTE	ESPORAS VIABLES/ ESPORAS TOTALES	CALIDAD ESPORAL (%)
SORIA 2	189/267	70,8
SORIA 3	92/124	74,2
GRANADA	141/211	66,8
NAVARRA	121/175	69,1
SARRIÓN	41/77	53,2
HUESCA	70/96	72,9
GRAUS	34/56	60,7
TERUEL	17/31	54,8
*HUESCA	56/86	65,1
*GRAUS	42/69	60,9
*TERUEL	29/47	61,7

Tabla 2: Tasa de micorrización de los lotes de según diferentes tratamientos.

LOTE	SUBSTRATO	SECADO	% MICORRIZACIÓN
SORIA 2	SIA3	45°-50°C	57.2
SORIA 2	2001A	45°-50°C	57.5
SORIA 3	SIA3	45°-50°C	58.3
GRANADA	SIA3	45°-50°C	51.3
GRANADA	2001A	45°-50°C	50.5
NAVARRA	SIA3	45°-50°C	59.5
NAVARRA	2001A	45°-50°C	61.3
SARRIÓN	SIA3	45°-50°C	56.5
HUESCA	SIA3	45°-50°C	60.7
GRAUS	SIA3	45°-50°C	61.3
TERUEL	SIA3	45°-50°C	51.9

*HUESCA	SIA3	Tª ambiente	53.9
*GRAUS	SIA3	Tª ambiente	57.2
*TERUEL	SIA3	Tª ambiente	55.1

Figura 3: Relación entre calidad esporal y tasa de micorrización

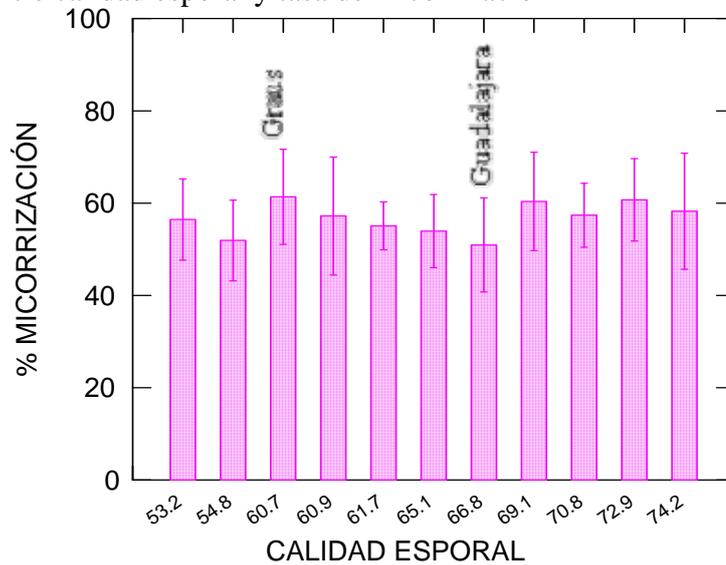


Tabla 3: Análisis de varianza de la tasa de micorrización

FUENTE	GL	CUADRADOS MEDIOS	F	PR > F
CALIDAD ESPORAL	10	68.306	0.935	0.511 ns
ORIGEN TRUFA	7	77.441	1.082	0.388 ns
SUBSTRATO	1	0.290	0.004	0.950 ns
SECADO	1	20.034	0.274	0.603 ns

Figura 4: Evolución temporal de la tasa de micorrización según la calidad esporal.

