

ESTUDIO DE LA RECEPTIVIDAD DE DIFERENTES SUELOS AGRÍCOLAS A LA CONSOLIDACIÓN DE LA SIMBIOSIS *QUERCUS ILEX* L. - *TUBER MELANOSPORUM* VITT.

OLMO David (1); PALAZÓN Carlos (2); BARRIUSO Juan (3); DELGADO Ignacio (2)

(1) Comité Aragonés de Agricultura Ecológica. Edificio Centrorigen. Ctra. Cogullada, 65. 50014 Zaragoza. E-mail: dolmo@caae-aragon.com

(2) D.G.A., CITA, Unidad de Sanidad Vegetal. Apartado 727. 50080-Zaragoza, España. E-mail: cpalazon@aragon.es

(3) Escuela Politécnica Superior de Huesca. Dpt. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. 22071-Huesca, España. E-mail: barriuso@unizar.es

Resumen:

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) es un hongo comestible que se desarrolla bajo tierra, con un considerable aprecio en la cocina de calidad. Está asociada a raíces de árboles y arbustos, destacando los géneros *Quercus* y *Corylus*, dando lugar a las micorrizas. Mediante la utilización de suelos de diferentes zonas geográficas de Aragón, se ha evaluado la influencia que tienen los hongos competidores sobre el grado de micorrización de *T. melanosporum* Vitt. en *Quercus ilex* L. Contabilizando el porcentaje de micorrización e identificando las micorrizas observadas, se puede averiguar si la presencia de hongos competidores hace peligrar el desarrollo de *T. melanosporum* Vitt. en las raíces de la planta huésped. Para estimar la viabilidad de una hipotética plantación trufera, es imprescindible llevar a cabo un estudio del comportamiento biótico del suelo, obteniendo información de la conveniencia o no de establecer dicha plantación en los terrenos seleccionados para dicho fin.

Palabras clave: truficultura, hongos, competidores, viabilidad, plantación trufera.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista sistemático se entiende por trufas los cuerpos fructíferos o carpóforos de hongos hipógeos pertenecientes a la clase *Ascomycete*, orden *Pezizales* y familia *Tuberaceae*, simbiontes ectomicorrícicos del género *Tuber*.

Vive asociado en simbiosis a raíces de árboles y arbustos, dando lugar a las micorrizas, que son unos órganos mixtos de intercambio de sustancias y nutrientes, que se forman entre la planta huésped y el hongo.

Cuatro son los géneros de plantas que destacan por su facilidad para establecer simbiosis micorrícicas con *Tuber* spp.: *Quercus*, *Corylus*, *Castanea* y *Cistus*.

El género *Tuber* comprende solamente hongos hipógeos, cuyo cuerpo fructífero (carpóforo) está asociado directa o indirectamente a las raíces de árboles y arbustos que crecen en simbiosis con él mismo, dando lugar a una estructura anatómica-fisiológica denominada micorriza. La micorriza es un órgano mixto de intercambio, que se forma entre las raíces de la planta huésped y el hongo.

INFLUENCIA DE LOS COMPETIDORES

La presencia de micorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt., no excluye la presencia de otros hongos en el sistema radicular. La cantidad de micorrizas de trufa negra varía durante el desarrollo del árbol y el grado de contaminación aumenta con la edad de la planta huésped.

Los principales contaminantes provienen de otros hongos del género *Tuber*, sobre todo *Tuber brumale* Vitt., también, *T. aestivum* Vitt., *T. rufum* Pico, *T. mesentericum* Vitt. y *T. excavatum* Vitt., además de los géneros *Hebeloma*, *Hymenogaster*, *Scleroderma* o incluso micorrizas no identificadas como las pertenecientes a la división *Basidiomycotyna*, o las denominadas tipo AD y tipo SB

Se considera un problema importante debido a que las especies de *Tuber* mencionadas anteriormente, son de menor calidad culinaria que *T. melanosporum*.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo primordial del presente trabajo reside en la determinación de la receptividad de diferentes suelos aragoneses a la simbiosis micorrícica, introducida de modo artificial entre *Quercus ilex* L. y *Tuber melanosporum* Vitt.

La mayor o menor receptividad de dichos suelos, mediante el estudio de la evolución de la simbiosis, nos conducirá a la calificación de la aptitud trufera de dicho suelo desde el punto de vista biológico.

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ENSAYO

Recordemos que el objetivo de este ensayo es determinar la influencia de los hongos existentes en el suelo (hongos autóctonos), sobre la capacidad de la trufa negra en formar micorrizas con la planta huésped.

Para ello se va a trabajar con dos factores distintos que son el grado de esterilización del suelo o sustrato y la distinta naturaleza de la tierra.

Las tierras usadas en el ensayo provienen de 5 parcelas distintas, sin contar la tierra testigo: Litago (Zaragoza), Valdeabeja-Alcalá del Moncayo (Zaragoza), Troncedo (Huesca), Puebla de Fantova (Huesca) y Montañana (Zaragoza).

Todas ellas, menos las de Montañana y testigo, proceden de zonas potencialmente truferas, donde se recogen trufas en las zonas limítrofes de las parcelas.

Las muestras de tierra de cada una de las parcelas se someten, previa tamización, a 5 grados distintos de esterilización: 0%, 25%, 50%, 75% y 100% excepto la tierra testigo que presenta un grado de esterilización del 100%. El diseño experimental comprenderá: (5 tierras x 5 grados de esterilización) + 1 testigo, lo que equivaldrá a 26 tratamientos, cada uno de los tratamientos contienen 4 repeticiones, por lo que el diseño final se resumirá del siguiente modo:

5 tierras problema x 5 grados de esterilización/tierra x 4 contenedores ó repeticiones/tierra/grado = 100 contenedores, reservando un tratamiento testigo con 4 contenedores, lo que hará un total de 104 contenedores ó plantas.

MICORRIZACIÓN ARTIFICIAL

La micorrización artificial consiste en poner en contacto de forma “no natural” a la planta huésped y al hongo. El resultado de esta unión simbiótica, son las micorrizas.

Para este estudio se emplea como planta huésped la encina (*Quercus ilex* L.), puesto que es el árbol trufero por excelencia en España.

El material vegetal empleado (bellotas) proviene de una zona trufera cercana a Graus (Huesca), el cual, se recogió en noviembre (plena madurez).

Para la micorrización se ha utilizado *Tuber melanosporum* Vitt. atendiendo a criterios de resistencia al medio y por su alto valor comercial. La trufa empleada en nuestros ensayos proviene de la comarca de Graus (Huesca).

Instalación en el invernadero:

Las bellotas de *Quercus ilex* L. se siembran en el invernadero, en cajas contenedoras plásticas de superficie enrejillada en todas sus caras, incluida la base, de 47x34'3x27 cm., conteniendo aproximadamente un lecho de 15 cm. de altura, de Vermiculita nº 3, que previamente había sido desinfectada al vapor para evitar la proliferación de patógenos.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero a una temperatura mínima de 15° C y máxima de 25° C. Se regaron con una frecuencia de tres riegos semanales, con una dosis de 1'5 mm. por riego, procurando que el sustrato estuviera en todo momento a su capacidad de campo.

Preparación inóculo y coadyuvante:

La trufa usada en el ensayo procedía de Graus (Huesca), micorrizando cada planta por el método de espolvoreo con talco descrito por *CARTIÉ et al.* (2000), con una cantidad de 0,3 g de trufa seca, lo que equivalía a 1,16 g de trufa fresca por planta.

Substratos de cultivo:

La tierra muestreada en campo se deja secar al aire libre para su correcto tamizado. Una vez

tamizada la tierra se divide en dos partes iguales, una de ellas se lleva al autoclave y se esteriliza a 121°C durante 1 hora, repitiendo la esterilización pasadas 24 horas. Dispondremos de 2 lotes de partida para cada muestra con un 0% y un 100% de esterilización sobre los que actuaremos mediante mezclado conveniente hasta alcanzar el resto de las proporciones requeridas: 25, 50 y 75%.

Metodología empleada en el control de la micorrización:

La evaluación del nivel de micorrización producida de modo artificial mediante inoculación de distintas especies vegetales con el hongo *Tuber melanosporum* Vitt., se realiza actualmente por diferentes métodos, sin que exista una unificación de criterios a nivel europeo.

En nuestro caso utilizamos el propuesto por PALAZÓN *et al.* (1999): 1°.- Lavado de la planta, 2°.- Observación a la lupa y 3°.- Conteo de micorrizas.

Para el conteo de micorrizas se coloca la planta huésped sobre la mesa, próxima a una regla o plantilla que nos permita dividir el aparato radicular de la planta en tres sectores (S1 = superior, S2 = medio y S3 = apical).

De cada sector se elegirán varias raíces, en las que se cuentan, con ayuda de la lupa binocular, los ápices micorrizados en 100 ápices.

Al final se obtienen 3 porcentajes de los que se calcula la media aritmética, que corresponde al porcentaje de micorrización (PM) de la planta analizada.

Para la clasificación de las micorrizas existentes se utilizaran las claves sistemáticas de GIRAUD (1988), AGERER (1994) y SÁEZ y DE MIGUEL (1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grados de micorrización obtenidos de *Tuber melanosporum*:

Los resultados obtenidos se podrían resumir en la “Figura 1”, donde se representa la media de micorrización, transcurridos 5 meses, para cada una de las tierras objeto del ensayo así como la distribución de las micorrizas de trufa entre los distintos sectores de la raíz (S1, S2 y S3). Se aprecia que el mayor número de ellas se sitúan en los sectores denominados S1 y S2, siendo el sector S3 el que presenta, con diferencia, el menor número de micorrizas. En las plantas con el sustrato testigo, con 100% de esterilización, los porcentajes de micorrización con *Tuber melanosporum* son de 41’8% para S1 (sector superior), 7’3% para S2 (sector medio) y del 0% para el S3 (sector apical), sin haberse detectado ninguna micorriza u hongo contaminante. Se ha observado que en este sustrato las plantas presentaban un desarrollo radicular muy pobre, de ahí el bajo porcentaje de micorrizas de los sectores S2 y S3.

La tierra de **Litago** presenta un bajo porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*, debido a que hay un elevado porcentaje de hongos competidores (tipo *Hebeloma* y tipo *Hymenogaster*). Se observa que con el 100% de esterilización, el porcentaje de micorrización sigue siendo bajo, por lo tanto la tierra no es la más adecuada, aunque cumpla con los requisitos físico-químicos.

La tierra de **Valdeabeja** presenta un porcentaje de micorrización medio, aunque muy aceptable si se tiene en cuenta el poco tiempo que ha pasado desde que se realizó la inoculación (\cong 5 meses).

En la tierra de **Troncedo** la micorrización resultante se puede considerar media. No se aprecian diferencias significativas entre el grado de esterilización y el porcentaje de micorrización.

La tierra de **Puebla de Fantova** presenta un buen porcentaje de micorrización de *T. melanosporum*, observándose un ligero incremento de la misma a medida que se aumentan los porcentajes de tierra esterilizada, que encuentra su valor máximo en el 75%.

El porcentaje de micorrización de trufa negra obtenido con la tierra de **Montañana** se puede considerar bueno. Se observa la influencia directa que conlleva aumentar el grado de esterilización sobre el porcentaje de micorrización, incrementándose éste también, de forma análoga al caso de la tierra de Puebla de Fantova.

Con respecto a la micorrización media obtenida para cada una de las tierras, se puede constatar que las parcelas con mayor porcentaje son la de Montañana y la de Puebla de Fantova,

seguidas por las de Troncedo y Valdeabeja, siendo la de menor la de Litago.

Micorrizas contaminantes y/o competidoras:

El análisis de las micorrizas en las diferentes tierras objeto del trabajo, ha permitido detectar la presencia de micorrizas competidoras que se han clasificado como tipo *Hebeloma*, tipo *Hymenogaster* y tipo AD.

Las micorrizas del tipo AD se han encontrado en la tierra correspondiente a las parcelas de Troncedo y Puebla de Fantova, aunque en unos porcentajes muy reducidos.

Los tipos *Hebeloma* e *Hymenogaster* sólo se han encontrado en la parcela de Litago, la presencia de estos dos competidores es muy elevada en comparación con la de *T. melanosporum* (“Figuras 2 y 3”).

Con un grado de esterilización del 0% y del 25%, las de tipo *Hebeloma* predominan muy significativamente sobre las de tipo *Hymenogaster*, pero si analizamos los resultados de la tierra esterilizada al 50%, se aprecia que las de tipo *Hymenogaster*, desplazan al resto de competidores, anulando la presencia de las de tipo *Hebeloma*, que vuelve a aparecer con un grado de esterilización del 75%, al mismo nivel y con los mismos porcentajes que aquél.

CONCLUSIONES

El bajo porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* en la parcela de Litago, aún cumpliendo los parámetros físico-químicos adecuados de las zonas truferas, es debido a la presencia de los competidores del tipo *Hebeloma* e *Hymenogaster*, lo que coincide con los trabajos de otros autores (GRANETTI *et al.*, 1992 ; BENCIVENGA *et al.*, 1992) que responsabilizan a los mismos de los bajos niveles de micorrización alcanzados.

Según FROCHOT *et al.* (1988) la estabilidad de la micorriza de *T. melanosporum* en una trufera está condicionada por factores físico-químicos y por factores bióticos. Los primeros han sido muy estudiados; los segundos han sido subestimados; de hecho cuando las condiciones bióticas no son óptimas, los fenómenos de sustitución de micorrizas retardan la producción de trufas o hacen aparecer especies menos apreciadas. Una de las especies de hongos que pueden sustituir a *T. melanosporum* es *Hebeloma* spp., como ha ocurrido en nuestro caso con alguna de las tierras ensayadas (Litago).

El mantenimiento de la asociación trufa-árbol parece depender del potencial del inóculo de otros hongos en el suelo y de la vegetación existente en la parcela antes de realizar la plantación trufera”.

En nuestro caso es evidente que la presencia de otros hongos, como *Hebeloma* spp. e *Hymenogaster* spp., ha comprometido seriamente la micorrización con *T. melanosporum*, en algunos de los sustratos, como el de Litago.

Si excluimos la tierra de Litago los porcentajes de micorrización de trufa negra para cada una de las tierras objeto del ensayo y para la tierra testigo, han sido bastante aceptables, teniendo en cuenta el poco tiempo transcurrido (\cong 5 meses) desde que se realizó la inoculación.

Respecto a las micorrizas encontradas del tipo AD, aunque son frecuentes en las plantaciones truferas (GRANETTI & BACIARELLI, 1997; ETAYO Y DE MIGUEL, 1998), su comportamiento de cara a *T. melanosporum* no está muy claro, ya que hay autores que la consideran competidora (DI MASSIMO *et al.*, 1996), y otros afirman que cohabita con ella (SOURZAT *et al.*, 1988).

En nuestro caso, no se puede sacar una conclusión fiable, dado el escaso número de plantas en las que ha hecho su aparición dicho hongo.

Como resumen general, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1.- La utilización de tierra de zonas truferas libres de contaminantes, favorece la correcta formación de la raíz, y con ello se incrementan las posibilidades de que se establezcan las micorrizas de *Tuber melanosporum*.

2.- En las tierras que presentan un escaso o nulo porcentaje de micorrizas competidoras, la esterilización es una práctica innecesaria, ya que no se observan diferencias significativas en el porcentaje de micorrización al cambiar los grados de esterilización.

3.- Si en la tierra en la que se va a instalar nuestra planta micorrizada con *Tuber melanosporum* existe un elevado inóculo de otros hongos contaminantes, como es el caso de Litago, la micorrización se verá desplazada frente a estos hongos micorrícicos, por lo general más

competitivos que la trufa negra.

4.- De las parcelas estudiadas, las que presentan una mayor aptitud a la micorrización con *T. melanosporum* son en orden decreciente: Montañana (S.I.A.), Puebla de Fantova, Valdeabeja, Troncedo y Litago.

Se ha comprobado que los resultados obtenidos, referentes a los contaminantes de las parcelas, coinciden fiablemente con los obtenidos en los seguimientos periódicos que son realizados por el equipo de investigadores del Departamento de Sanidad Vegetal del CITA.- DGA en las mismas parcelas. Con esto se llega a la conclusión que puede ser interesante, antes de llevar a cabo una nueva plantación trufera, estudiar el comportamiento biótico del suelo mediante un ensayo similar al expuesto en este trabajo. Con ello seremos capaces de diagnosticar si tenemos contaminantes o no, en dicha parcela, y en un plazo de 5 meses, que es el tiempo mínimo previsto para su ensayo de micorrización, estaremos en disposición de establecer la viabilidad de una hipotética plantación.

No debemos olvidar que una de las causas que más retrasan la progresión de la truficultura estriba en la inseguridad del arraigo de las micorrizas de *T. melanosporum*, lo que pueden demorar el inicio de la producción de trufas entre 6 y 12 años.

Con este estudio se establece una previsión de viabilidad que, en el plazo referido de 5 meses, indicará la conveniencia o no de establecer una plantación de encina con trufa negra en los terrenos seleccionados para dicho fin.

BIBLIOGRAFÍA

- AGERER, R.; 1994. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag.
- CARTIÉ, G.; PALAZÓN C.; DELGADO I. y BARRIUSO J.; 2000. 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. Actas V International Congress Science and Cultivation of Truffle, 6.296-6.299, Aix-en-Provence (Francia).
- BENCIVENGA, M.; DONNINI, D. & DI MASSIMO, G.; 1992. Analisi delle micorrize in una tartufaia coltivata di *Tuber melanosporum* undici anni dopo l'impianto. Micologia e vegetazione mediterranea, Vol. 7, 1: 159-171.
- DI MASSIMO, G.; GARCIA-MONTERO, L.G.; MANJÓN, J.L. y DIEZ, J.; 1996. Hongos micorrícicos competidores de *Tuber nigrum* Bull. (= *Tuber melanosporum*) presentes en ecosistemas naturales y viveros del centro de España. Bol. Soc. Micol. Madrid, 21: 189-199.
- ETAYO, M.L. y DE MIGUEL, A.M.; 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Oloriz (Navarra). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra, serie botánica, 11, 55-114.
- FROCHOT, H.; CHEVALIER, G.; BARDET, M.C. & AUBIN, J.D.; 1988. Effet de la desinfection du sol et des antecedents culturaux sur l'évolution de la mycorrhization avec *Tuber melanosporum* sur noisetier. 2º Congrès international sur la truffe, Spoleto (Italia). Pp: 289-296. Spoleto.
- GIRAUD, M.; 1988. Prélèvement et analyse de mycorrhizes. Pp 49-63 in: CTIFL (ed.), La Truffe, FNPT10, Congrès de la trufficulture, Saintes, 27-28 november 1987.
- GRANETTI, B. & BACIARELLI FALINI, L.; 1997. Competizionetra le micorrize di *Tuber melanosporum* Vitt. e quelle di altri funghi in una tartufaia coltivata a *Quercus ilex* L. Mic. Ital., 1: 45-59.
- PALAZÓN, C.; CARTIÉ, G.; DELGADO, I. y BARRIUSO J.; 2000. 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. Actas V International Congress Science and Cultivation of Truffle, 6.311-6.313, Aix-en-Provence (Francia).
- SÁEZ, R y DE MIGUEL, A.; 1995. Guía práctica de la truficultura. ITG Agrícola y Universidad de Navarra.
- SOURZAT, P.; MURATET, G. & SCHNEIDER, J.P.; 1988. Observations sur le statut mycorrhizien de jeunes arbres truffiers dans un essai de desinfection du sol au bromure de methyle. 2º Congrès international sur la truffe, Spoleto (Italia), Pp: 283-288. Spoleto.

Figura 1: Distribución de la micorrización de *T. melanosporum* en los diferentes sectores de la raíz, a los 5 meses de la inoculación, y micorrización media de las tierras del ensayo.

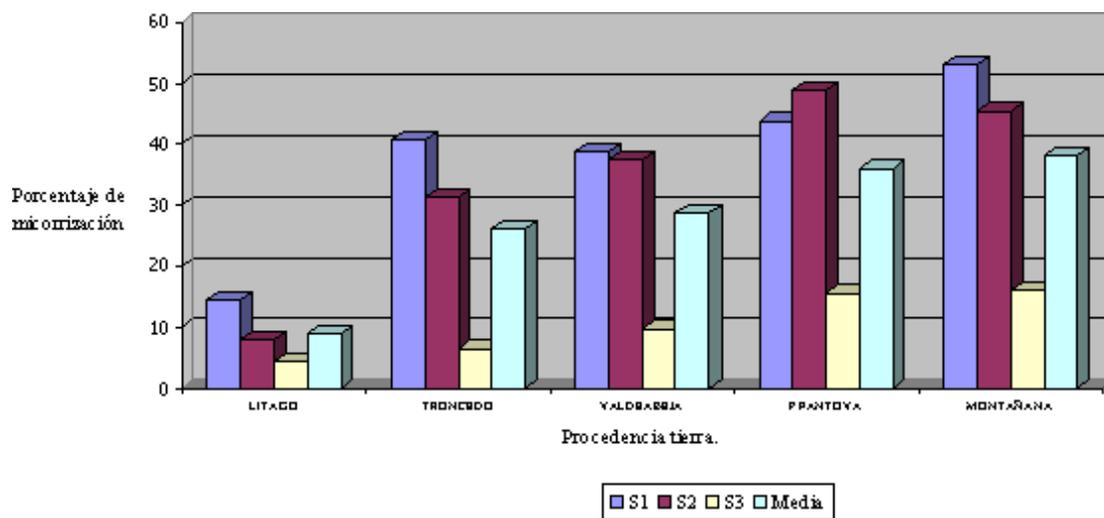
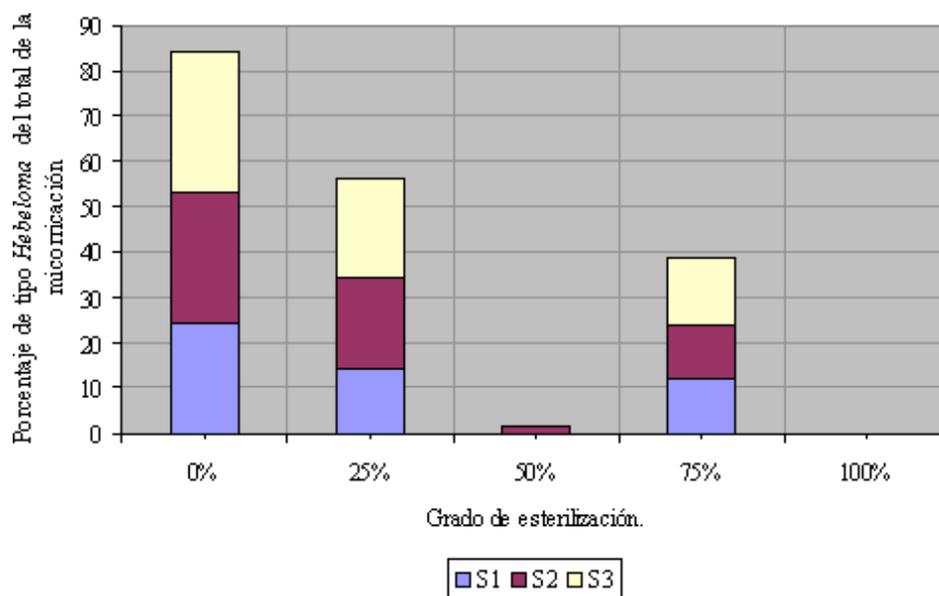


Figura 2: Distribución de micorrizas competidoras del tipo *Hebeloma* en la tierra de Litago, a los 5 meses de la micorrización con *T. melanosporum*



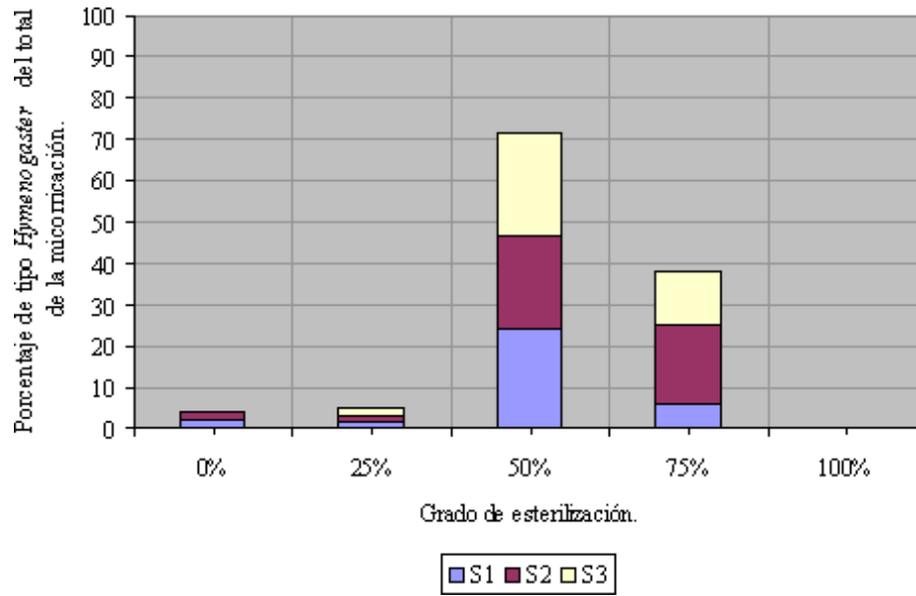


Figura 3: Distribución de micorrizas competidoras del tipo *Hymenogaster* en la tierra de Litago, a los 5 meses de la micorrización con *T. melanosporum*