

# FLORA ARVENSE ASOCIADA AL CULTIVO DE LA TRUFA EN ZARAGOZA Y SU COLONIZACIÓN POR ENDOMICORRIZAS VESÍCULO ARBUSCULARES (VAM).

BORRAZ MINGORANCE Ana (1); BARRIUSO Juan (1); PALAZÓN Carlos (2).

(1) Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Ctra. De Cuarte s/n, 22071, Huesca. E-mail: [mingofillola@hotmail.com](mailto:mingofillola@hotmail.com) y [barriuso@unizar.es](mailto:barriuso@unizar.es)

(2) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón. Apartado 727. 50080 Zaragoza, España. E-mail: [cpalazon@aragon.es](mailto:cpalazon@aragon.es)

## Resumen.

En el artículo que se presenta a continuación se ha determinado el estudio de los hongos ectomicorrízicos vesículo arbusculares (VAM) en una plantación trufera de *Quercus ilex* situada en Montañana (Zaragoza), donde se ha pretendido establecer el efecto alelopático de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* sobre las arvenses muestreadas, así como el análisis de las estructuras endomicorrízicas (arbúsculos, vesículas y esporas) obtenidas de la comparación de los resultados extraídos de los quemados con los de las calles (entre las hileras de *Quercus ilex*) para los diferentes tratamientos agronómicos. Para esto se ha utilizado la Técnica modificada de GIOVANNETTI y MOSSE, (1980) en la cuantificación de la longitud de raíz infectada por las endomicorrizas y la Técnica de SIEVERDING (1983) para la obtención de las frecuencias de infección de las estructuras fúngicas VAM.

**Palabras clave:** *Tuber melanosporum*, adventicias, *Quercus ilex*, ectomicorrizas, endogonales, Laboreo.

## INTRODUCCIÓN.

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) es un hongo Ascomiceto comestible hipogeo, es decir, se desarrolla bajo tierra y vive en simbiosis con la raíz de un árbol huésped de la familia de las *Fagaceae* (encina, roble, coscoja) y de las *Betulaceae* (avellano). La micorriza, la cual se forma entre las raíces del árbol y el micelio del hongo actúa como órgano de intercambio y gracias a ello el hongo utiliza los hidratos de carbono que la planta obtiene de la fotosíntesis. La planta, a su vez, recibe beneficios tales como una mayor capacidad de absorción de nutrientes y de agua (REYNA, 2000).

Normalmente todas las plantas truferas acaban formando en el terreno una zona desprovista de vegetación que se conoce como quemado, trufal, calvero o pelado. La causa de que se produzca este fenómeno radica en el efecto de antibiosis que tiene el micelio de la trufa expandido por el suelo que impide la germinación o el desarrollo de otros vegetales, este fenómeno se denomina alelopatía.

Existen siete tipos de micorrizas que se diferencian por las formas de las hifas en la raíz, por las características de la infección y por los organismos mutualistas que la establecen. Nuestro estudio se centra en las micorrizas endotróficas o endomicorrizas formadas por hongos *Zygomycotina*, encontrando estructuras en las raíces tales como hifas (no septadas cuando son jóvenes y ramificadas en el centro de la corteza); arbúsculos (haustorios intrincados ramificados en las células de la corteza); vesículas (estructuras de almacenaje).

Se observan también estructuras en el suelo, fuera de las raíces, como hifas (red de hifas en el suelo con algunas más gruesas que actúan de conductores y con hifas más delgadas ramificadas para obtener los alimentos); y esporas sexuales (BRUNDRETT *et al.*, 1985).

El estudio se basa en la justificación de la presencia o ausencia de la flora arvensis encontrada tanto en los quemados como en las calles de la plantación trufera de *Quercus ilex*, comprobando la influencia del efecto alelopático de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* sobre las arvenses muestreadas. Asimismo se procede al análisis de endomicorrizas vesículo arbusculares (VAM) existentes en las raíces de las adventicias, evaluando el porcentaje de micorrización y la presencia de otras estructuras fúngicas como vesículas, arbúsculos y esporas, estableciendo una comparación de los resultados de la flora arvensis seleccionada en los diferentes tratamientos agronómicos y evaluando el avance de la colonización de endomicorrizas en función de la evolución estacional de las

arvenses estudiadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

El estudio se ha efectuado durante el año 2004-05, entre el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (C.I.T.A.) de Zaragoza donde se tomaron los ejemplares y la Escuela Politécnica Superior de Huesca (EUPH) en la que se realizaron los preparativos y la observación mediante microscopía óptica de las raíces muestreadas.

La plantación trufera del estudio se encuentra situada a 216msnm en el valle del Ebro y consta de *Quercus ilex*, *Quercus faginea* y *Corylus avellana*, con un total de 292 ejemplares que se encuentran distribuidos dentro de la parcela en subparcelas cada una de ellas con diferentes tratamientos agronómicos. Este trabajo de investigación se ha centrado en las subparcelas donde han sido aplicados los laboreos máximo, continuado y mínimo para la especie de *Quercus ilex*. Para cada uno de los laboreos se han tomado muestras tanto en los quemados producidos por el hongo Ascomiceto *Tuber melanosporum* Vitt. como en las calles de separación de las hileras de los árboles estableciendo comparación de los resultados de la flora arvense seleccionada en los diferentes puntos de muestreo.

El material vegetal tomado engloba especies de las familias *Poaceae*, *Compositae*, *Brassicaceae* y *Plantaginaceae*, muestreándolas cada tres semanas durante un periodo comprendido entre los meses de Febrero y Octubre.

Las raíces de las adventicias extraídas son primeramente lavadas con agua destilada para la eliminación de la tierra adherida. Tras este paso se procede a su esterilización en autoclave mediante la técnica modificada de PHILLIPS y HAYMAN (1970) para su posterior tinción, este paso es necesario para la observación de las estructuras fúngicas vesículo arbusculares VAM, debido a que a simple vista estas no pueden detectarse por la pigmentación natural de las plantas. Finalizados los pasos de limpieza, autoclavado y tinción, se colocan porciones de raíz en los portaobjetos preparados previamente con una cuadrícula para la observación en el microscopio óptico (foto 1).

Los métodos matemáticos empleados en la cuantificación de la longitud de raíz infectada por VAM se basan en la técnica modificada de GIOVANNETTI y MOSSE, (1980) que consiste en recorrer la cuadrícula del portaobjetos anotando tanto el número de cortes de la raíz con la cuadrícula como la cantidad de veces en que cada corte se encuentra micorrizado (cuadro 1). Para la obtención de frecuencias de infección de estructuras fúngicas VAM (vesículas, arbusculos y esporas) se utiliza la técnica de SIEVERDING (1983) que se fundamenta en recorrer la cuadrícula del portaobjetos observando los campos visuales (cada cuadradito) y determinar la presencia o ausencia de estas estructuras en cada campo (cuadro 2).

Con los datos obtenidos se procede a la realización de los ensayos estadísticos de comparación de medias mediante el programa estadístico SPSS.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Observando los resultados correspondientes a la evolución de la infección endomicorrícica en las raíces en función del crecimiento y desarrollo de las especies muestreadas para las familias *Poaceae*, *Compositae*, *Brassicaceae* y *Plantaginaceae*, se han observado picos de disminución en la evolución de los porcentajes de micorrización coincidiendo en el tiempo con los períodos de mayor actividad de las plantas, tales como germinación y floración, debido a la actividad radicular de las mismas como se observa en el ejemplo de la gráfica 1. Los aumentos que se detectan en el crecimiento de la raíz pueden exceder la capacidad infectiva de los hongos, disminuyendo la infección micorrícica durante los periodos favorables para el crecimiento de la planta (DODD y JEFFRIES, 1986).

En el estudio del efecto alelopático producido por las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* sobre las adventicias muestreadas en la plantación trufera se establece que para especies como *Crepis taraxifolia* y *Podospermum laciniatum* (familia *Compositae*) la baja densidad observada en los quemados puede ser debida al efecto alelopático producido por *Tuber melanosporum* sobre la germinación y el crecimiento de las adventicias. Dentro de esta misma familia se han estudiado especies como *Sonchus oleraceus* donde las ectomicorrizas de *Tuber* no le afectan apareciendo

elevada cantidad de dichas arvenses en los quemados. En otra de las familia estudiadas, *Poaceae* (*Gramineae*), se establece que especies como *Hordeum murinum* y *Bromus arvensis* tienen la capacidad de aparecer con frecuencia elevada en los quemados afectándoles en menor medida el efecto de las ectomicorrizas de *T. melanosporum*, esto no ocurre en *Cynodon dactylon* donde la escasa aparición de esta especie en los quemados es consecuencia del efecto inhibitorio de las ectomicorrizas. Se ha detectado el efecto alelopático en la especie como *Diplotaxis erucoides*, (*Brassicaceae*) y en *Plantago lanceolata*, (*Plantaginaceae*). Por tanto, y a tenor de los resultados podríamos establecer la conclusión de que especies de la misma familia no se ven afectadas del mismo modo por la presencia de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* en los quemados (cuadro 3).

En la determinación de los análisis estadísticos de las endomicorrizas vesículo arbusculares (VAM) se destaca como para los parámetros porcentaje de micorrización (foto 2) y vesículas (foto 3), en las familias *Poaceae* y *Compositae*, se presentan diferencias significativas entre los datos obtenidos siendo mayores en los quemados frente a las líneas estableciendo la conclusión de mayor capacidad de colonización de los hongos endomicorrícicos VAM en los quemados debido a que el laboreo les afecta en menor medida (frente a las líneas) produciéndole menor daño sobre el micelio de los hongos endomicorrícicos, generando una mayor infectividad sobre las arvenses y como consecuencia se produce un mayor porcentaje de micorrización y de vesículas en las adventicias muestreadas en los quemados. Para las familias *Brassicaceae* y *Plantaginaceae* no se han detectado diferencias entre los quemados y las líneas. Otro de los parámetros a estudio de las endomicorrizas son los arbusculos (foto 4) estableciéndose para la familia *Poaceae* la determinación de mayor cantidad en las líneas a diferencia de las especies estudiadas para las familias *Compositae*, *Brassicaceae* y *Plantaginaceae* donde no se detectan diferencias significativas. El estudio de esporas (foto 5) nos presenta diferencias entre los quemados y las líneas para las familias *Poaceae* y *Brassicaceae* contabilizándose mayores cantidades en los quemados donde la infectividad de las endomicorrizas VAM sea mayor. No se han presentado diferencias para las familias *Compositae* y *Plantaginaceae*.

## CONCLUSIÓN.

Mediante el estudio de comparación de la evolución micorrícica en función de la evolución estacional para cada una de las arvenses se ha observado como se produce una disminución de dicha infección en los periodos que coinciden con un mayor crecimiento, desarrollo y floración de las adventicias.

Se ha intentado establecer el efecto alelopático como consecuencia de la antibiosis de *Tuber melanosporum* sobre las adventicias muestreadas en los quemados, detectándose que no todas las especies de una misma familia sufren el mismo efecto. Del mismo modo se ha determinado el mayor efecto de las endomicorrizas vesículo arbusculares (VAM) en los puntos denominados como quemados debido a que no se aplica laboreo en estas zonas y por tanto el micelio de los hongos no se ve afectado, provocando este una mayor infectividad sobre la flora arvense.

## BIBLIOGRAFÍA.

- BRUNDRETT, M. C., PICHÉ, y PETERSON, R.L.; 1985. A developmental study of the early stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany* 63, 184-194.
- DODD, J.C. y JEFFRIES, P.; 1986. Early development of VA mycorrhizas in autumn sown wheat. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 149-154.
- GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. ; 1980. An evaluation of the Techniques for measuring vesicular arbuscular infection in roots. *New Phytol.*, 84: 489-500.
- PHILLIPS, J. y HAYMAN, D.; 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

REYNA, S.; 2000. Trufa, Truficultura y selvicultura trufera. Ediciones Mundi-prensa. Madrid

**Cuadro 1:** Cálculo del porcentaje de colonización micorrícica mediante la Técnica modificada d GIOVANNETTI y MOSSE, (1980).

$$\% \text{ colonización micorrícica} = \frac{n^{\circ} \text{ cortes de la raíz micorrizada}}{n^{\circ} \text{ cortes totales}}$$

**Cuadro 2:** Cálculo de las frecuencias de infección de estructuras fúngicas VAM mediante la técnica de SIEVERDING (1983).

$$F (\%) = 100 (N - n^0) / N$$

F (%) = frecuencia de infección en porcentaje.

N = número total de campos visuales.

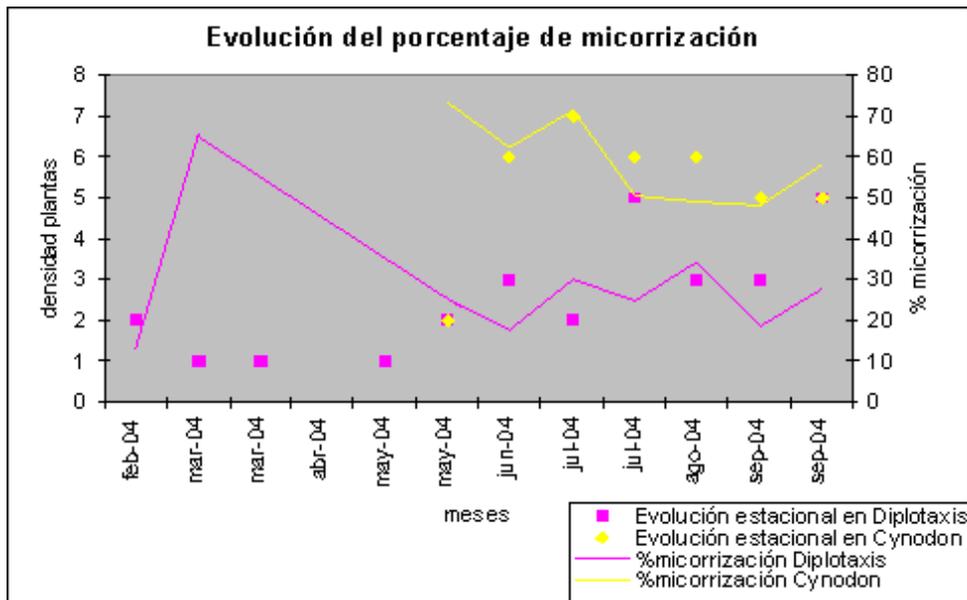
(N - n<sup>0</sup>) = número de campos en los que aparecen las estructuras propias de las VAM.

**Cuadro 3:** Lista de especies y su relación con las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum*.

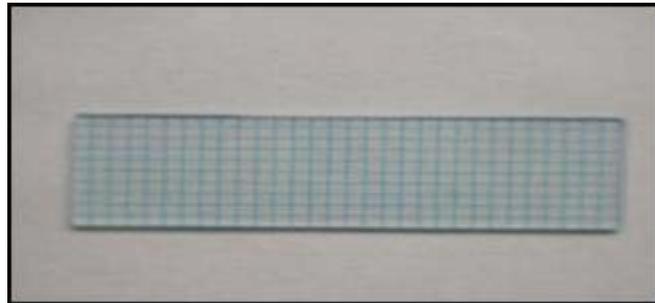
Efecto alelopático	no efecto alelopático
--------------------	-----------------------

FAMILIA	ESPECIE	EFEECTO ALELOPÁTICO
<i>Compositae</i>	<i>Crepis taraxifolia</i>	
	<i>Podospermum laciniatum</i>	
	<i>Sonchus oleraceus</i>	
	<i>Calendula arvensis</i>	
<i>Poaceae</i>	<i>Hordeum murinum</i>	
	<i>Bromus arvensis</i>	
	<i>Cynodon dactylon</i>	
	<i>Poa annua</i>	
<i>Brassicaceae</i>	<i>Diplotaxis eruroides</i>	
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	

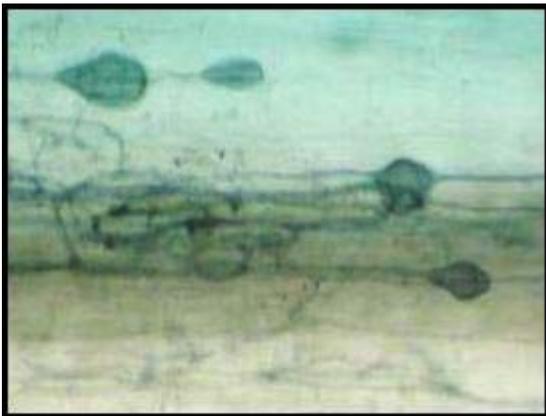
**Gráfica 1:** Evolución de la densidad de plantas muestreadas frente a la evolución en los porcentajes de micorrización en función del tiempo para las especies *Cynodon dactylon* y *Diplotaxis eruroides*.



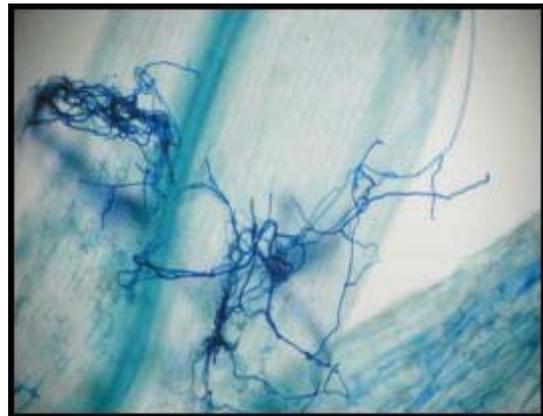
**Foto 1:** Portaobjeto con cuadrícula. BARRIUSO VARGAS.



**Foto 2:** Hifas en *Bromus arvensis*.  
Tinte utilizado azul tripan. 100 X  
BORRAZ MINGORANCE, 2004.



**Foto 3:** vesículas en *Sonchus oleraceus*  
Tinte utilizado negro clorazol. 100X  
BORRAZ MINGORANCE, 2004



**Foto 4:** Arbusculos formando líneas en *Crepis*.  
Tinte utilizado azul tripan. 40X.  
BORRAZ MINGORANCE, 2004



**Foto 5:** Espora en *Hordeum murinum*  
Tinte utilizado negro clorazol. 100X.  
BORRAZ MINGORANCE, 2004

