

Título: ECTOMICORRIZAS EN EL CULTIVO DE TRUFA NEGRA: ECOLOGÍA, DIVERSIDAD Y GESTIÓN

Nombre: Sánchez Durán, Sergio

Universidad: ZARAGOZA

Fecha de lectura: 18/05/2012

Dirección:

- > **Director:** Juan José Barriuso Vargas
- > **Director:** ANA MARIA DE MIGUEL VELASCO

Tribunal:

- > **presidente:** CARLOS FERNANDO PALAZON ESPAÑOL
- > **secretario:** DOMINGO BLANCO PARMO
- > **vocal:** ERNESTO PÉREZ COLLAZOS
- > **vocal:** SANTIAGO REYNA DOMENECH
- > **vocal:** Sergi Garcia Barreda

Descriptores:

- > HONGOS
- > SIMBIOSIS

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: La truficultura es una actividad agroforestal atípica, en la que se cultiva un hongo en las raíces de un árbol vivo, lo que impide evaluar su desarrollo de un modo rápido y sencillo como en cualquier otro caso. Deben realizarse análisis de raíces para comprobar la presencia del hongo de interés o si los árboles están siendo colonizados por otras especies que puedan comprometer el éxito de las plantaciones. La presente memoria se ha centrado en conocer la identidad de esos hongos, su ecología y la posibilidad de gestionar su presencia en los árboles truferos tanto en su fase de campo como de vivero.

Los trabajos de campo comenzaron por la selección de 48 encinas truferas de diferentes edades, localizadas en la provincia de Teruel, siendo la mitad de ellas ya productoras de trufa negra y la otra mitad no productoras. Sobre cada árbol se realizaron 5 análisis periódicos de ectomicorrizas (ECM) durante dos años, empleando dos métodos de muestreo diferentes: extracción directa de ápices radiculares y toma de cilindros de suelo. Además se realizó un muestreo exhaustivo de 9 de ellas con la intención de poner a punto un método de muestreo por cilindros de suelo que fuese capaz de evaluar de un modo fiable la riqueza específica de cada árbol. Por otro lado se recogió tierra cercana a varios árboles y con ella se realizaron bioensayos en invernadero para comparar los hongos formadores de ECM que aparecían con los ya establecidos en la plantación.

Los análisis generaron un listado de 107 morfotipos diferentes, de los que 11 pudieron identificarse morfológicamente hasta nivel de especie y 23 hasta género. Los más frecuentes fueron: *Tuber melanosporum*, *Trichophaea woolhopeia*, *Tuber brumale*, *Pisolithus arhizus* y *Quercirhiza squamosa*. Los análisis de ADN

realizados sobre este último parecen confirmar que se trata de la especie *Tomentella badia*, pero no se consiguió añadir nuevas identificaciones por este método. El tipo exploratorio dominante fue el de corta distancia y el orden más representado Thelephorales. No se encontró ningún morfotipo capaz, a priori, de desplazar a las ECM de la trufa negra de las raíces y tampoco posibles indicadores de aptitud trufera de terrenos.

En el 58% de los árboles el número de morfotipos de ECM encontrado fue de uno a tres y el número máximo en un solo árbol 21. Se ha podido constatar que, tanto la riqueza como la distribución de la abundancia de las especies son más altas en árboles no productores y mayores de 9 años. Estos árboles presentan, además, una mayor proporción de tipos exploratorios más evolucionados.

La presencia y dominancia de *Tuber melanosporum* fue generalizada a lo largo del trabajo, lo que prueba el gran potencial trufero de la provincia de Teruel. Para detectar si esta especie está presente en una plantación, sería necesario analizar un máximo de cuatro árboles, tomando una sola muestra en cada uno. Sin embargo la sola presencia de la especie no es un indicador suficiente de la evolución correcta de la plantación hacia la producción de trufa negra. Por otra parte su ausencia sí que determina la toma de decisiones sobre el futuro de las plantaciones.

La riqueza observada en los bioensayos parece estar correlacionada con la de las propias plantaciones, aunque difieren en cuanto a los morfotipos presentes. En los plantones cultivados sobre sustrato de las parcelas se encontró una gran frecuencia de aparición de ECM del complejo *Tuber borchii*. Esto prueba tanto su amplia distribución como su carácter exclusivamente pionero, pues no se detectó en los análisis de las ECM ya establecidas en las mismas plantaciones. En cambio, *Trichophaea woolhopeia* es capaz de colonizar tanto plantas jóvenes como adultas, manteniéndose en sus raíces hasta etapas avanzadas de la plantación.

Los trabajos pormenorizados sobre ciertas especies se centraron en dos líneas: por un lado, estudiar la biología y las posibilidades de control del mayor competidor de vivero (*Sphaerosporella brunnea*) y el de plantaciones (*Trichophaea woolhopeia*) y por otro, desarrollar métodos moleculares de detección. Uno de ellos se basa en RFLP y otro en PCR a tiempo real y permiten identificar, además de *Tuber melanosporum* y en cualquier tipo de muestra, cualquiera de las especies que tienen o podrían tener en el futuro una gran incidencia en truficultura: *T. brumale*, *T. aestivum* y *T. indicum*. El primer método resulta rápido y económico, mientras que el segundo es también la base para iniciar futuros trabajos sobre cuantificación de micelio.

Empleando aislados monospora de *S. brunnea* se realizaron diferentes experiencias in vitro e in vivo encaminadas a conocer más sobre su biología y a localizar un método de control entre: gestión del riego, aplicación de un producto bioestimulador de plantas con ciertas propiedades antifúngicas (Tronver Eco®) y control biológico con hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*. A pesar de la cercanía taxonómica de *S. brunnea* y *Trichophaea woolhopeia*, ambas especies parecen tener necesidades muy diferentes para completar su ciclo biológico.

S. brunnea es una especie ectomicorrícica con un comportamiento saprofito facultativo. En cultivo en placa produce conidióforos y artrosporas con función de resistencia, presenta una altísima velocidad de crecimiento y es capaz de formar ECM a partir de fragmentos de micelio y de esporas asexuales con una gran rapidez (en

menos de dos meses). A partir de las pruebas realizadas, se ha comprobado que la composición del medio de cultivo influye sobre el crecimiento y formación de micelio de *S. brunnea* y se ha obtenido un método de producción de esporas asexuales fiable y repetible, que puede ser usado en ensayos de inoculación. Parece demostrado el homotalismo de la especie, al formar apotecios tras inoculaciones con material procedente de una sola ascospora.

Se consiguió controlar su crecimiento *in vitro* empleando un producto bioestimulador, Tronver Eco®, y dos aislados de *Trichoderma harzianum*, no así con el empleo de bacterias. Sin embargo, las tres alternativas fracasaron en su control *in vivo*. No obstante, la aparente inocuidad sobre *Tuber melanosporum* tanto del producto bioestimulador como de las *Pseudomonas* estudiadas (*P. rhizosphaerae*, *P. putida* y *P. fluorescens*), mantiene la posibilidad de su uso en posteriores ensayos.

El único tratamiento que controló la micorrización por *S. brunnea* fue la gestión del riego. El desarrollo de esta especie se ve significativamente aumentado con aplicaciones muy frecuentes (a diario) y además *T. melanosporum* parece soportar reducciones drásticas de la frecuencia de riego.

En el presente trabajo se ha aumentado el conocimiento sobre los competidores de la trufa negra en las diferentes fases de su cultivo y se han generado métodos que pueden ser la base de trabajos que contribuyan a gestionar su efecto sobre la truficultura.