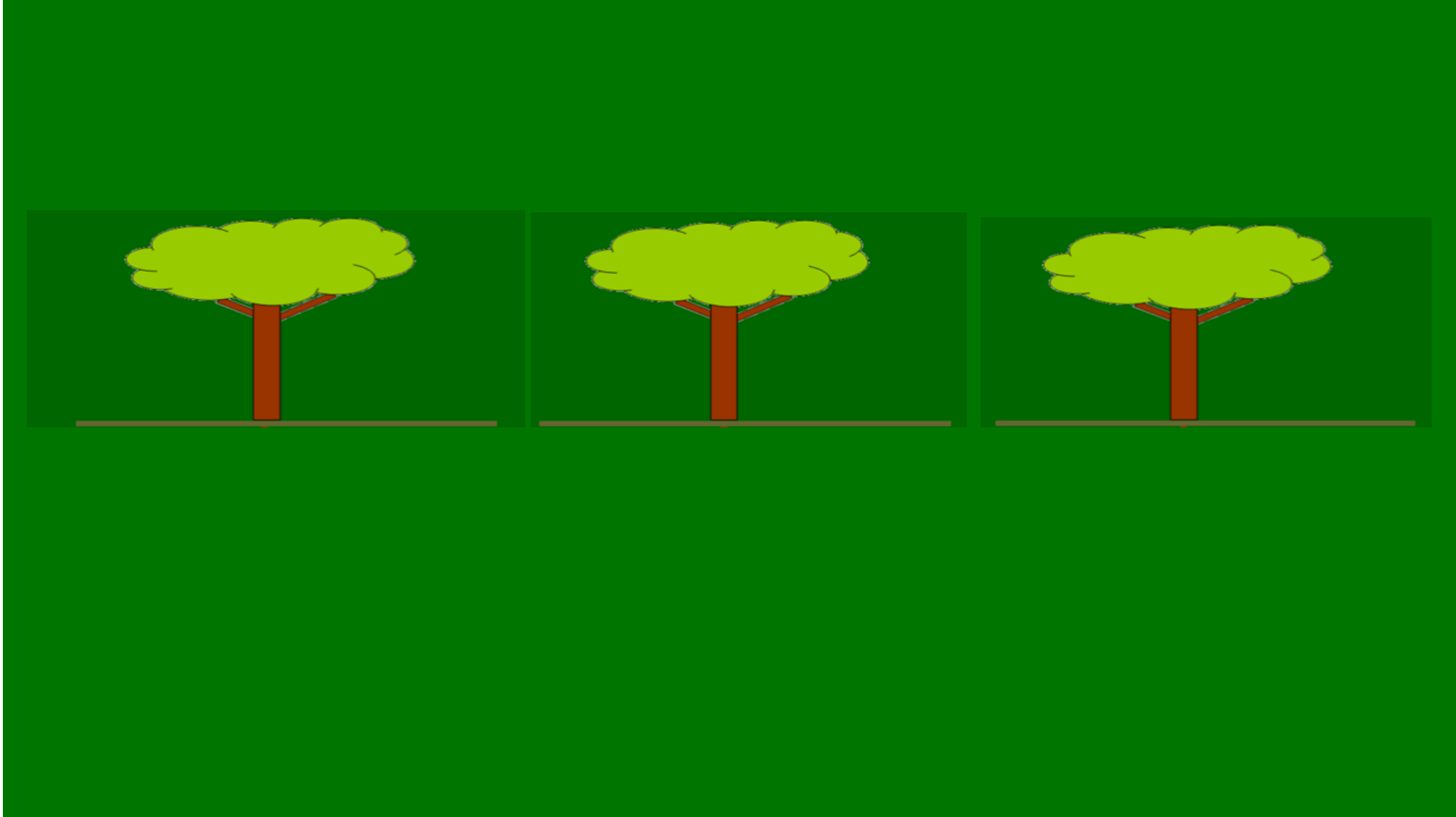


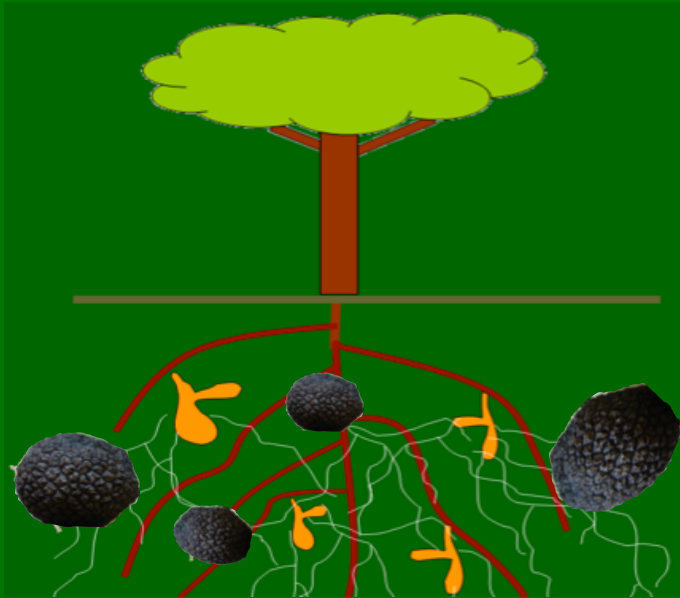


Control y evaluación de plantaciones trufieras

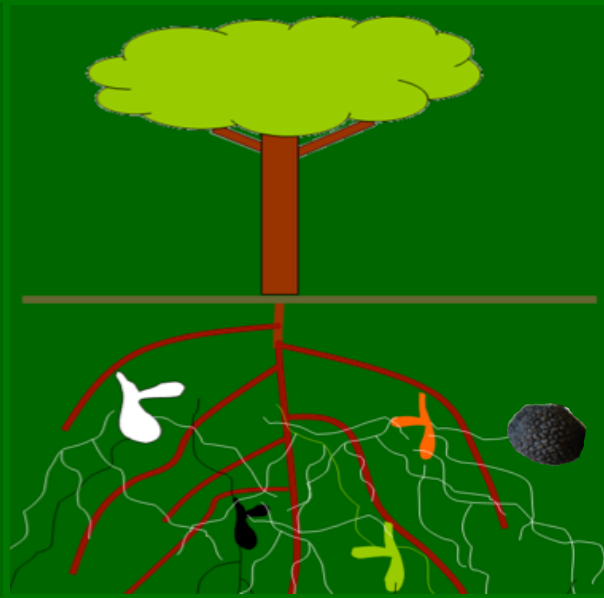
Sergio Sánchez Durán
ssanchezd@aragon.es



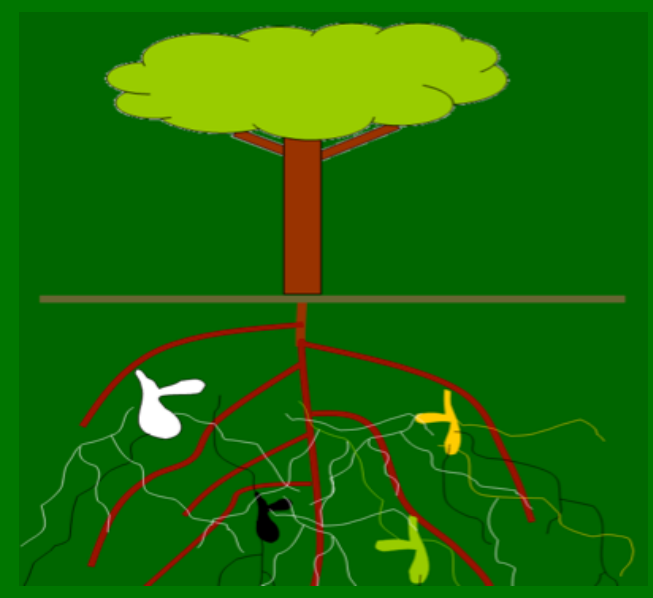




Dominando



Conviviendo



Desplazada

Evaluación de micorrización en truficultura

Objetivos:

- Comprobar que el hongo inoculado se encuentra en las raíces y en qué cantidad
- Descartar presencia de otros hongos:
 - no inoculados (presentes en el ambiente)
 - inoculados por error (vivero o aportes)

Fase de campo



Principales características:

- Condiciones ambientales no controladas y dudas de manejo
- Suelo cargado de microorganismos
- Evaluación del estado de micorrización: comprobar que el hongo persiste y qué otras micorrizas se están formando
- Contaminaciones muy frecuentes
- Imposible revisar el sistema radical completo

Métodos de muestreo en campo

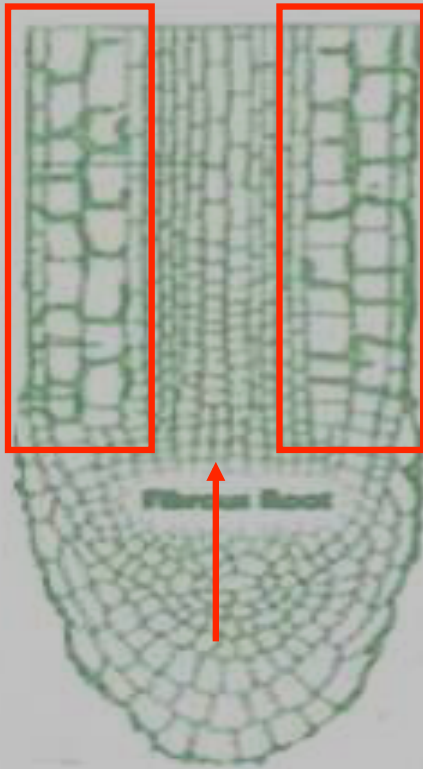
Directo



Cilindros

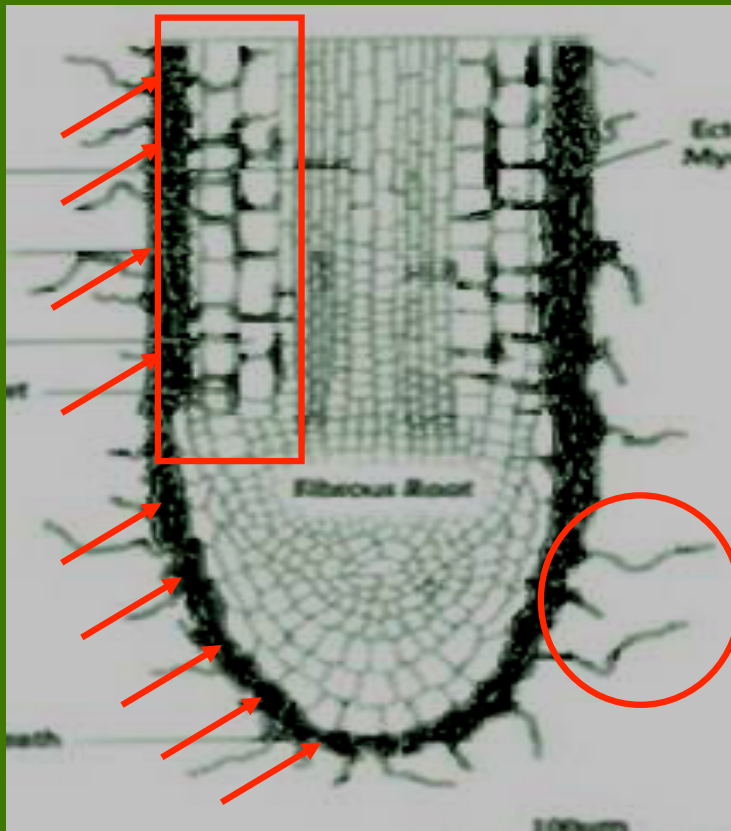


Ápice NO micorrizado

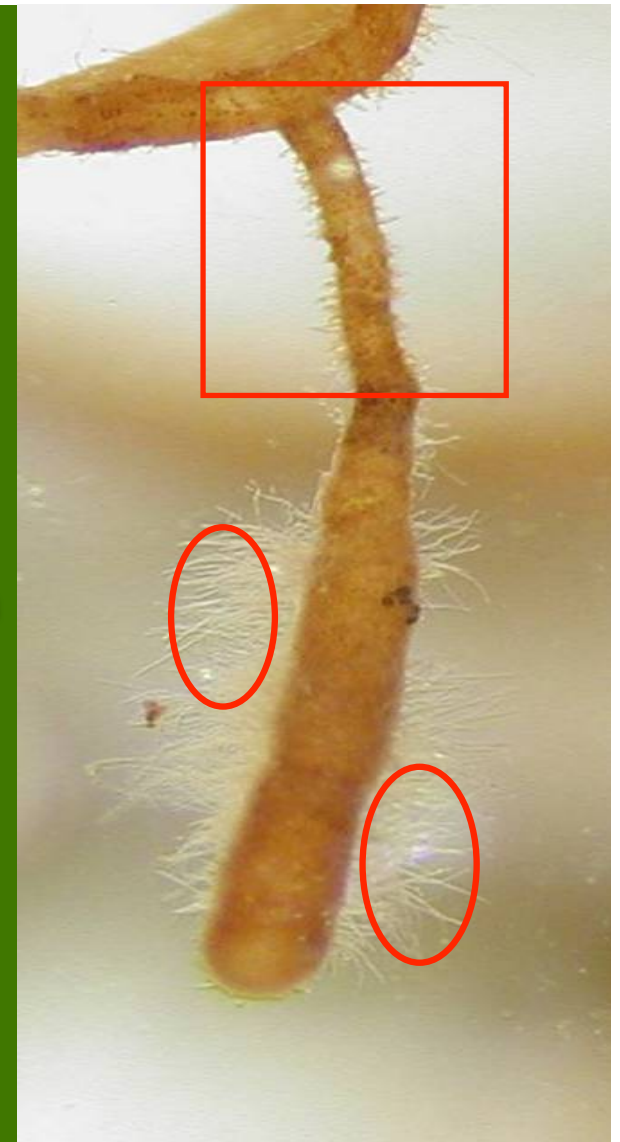


- Pelos radiculares.
- Corteza.
- Médula.

Ápice micorrizado



- Las hifas del hongo penetran entre las células de la corteza formando la **Red de Hartig** (zona de intercambio).
- Las hifas del hongo rodean el ápice, engrosándolo (**Manto**).
- **Elementos que emanan** del manto: exploran el suelo.
 - Cistidios
 - Hifas
 - Rizomorfos



Análisis molecular de ectomicorrizas

Necesarios en vivero y plantación para:

- Confirmar la especie de micorrizas de *Tuber* que no muestran todos los caracteres morfológicos (normalmente por ser jóvenes o muy viejas):
 - ejemplos:
 - *T. melanosporum*, *T. indicum* y *T. brumale* tienen el mismo tipo de manto, si no han formado hifas son muy difíciles de reconocer.
 - *T. melanosporum* y *T. indicum* tienen, además, el mismo tipo de cistidios. Son indiferenciables por morfología.
 - *T. aestivum/uncinatum*, *T. mesentericum*, *T. malençonii*, etc. también tienen el mismo tipo de manto.
 - Método: Análisis de ADN por PCR usando cebadores específicos, en ocasiones varios en una misma reacción (multiplex).
- Identificar micorrizas desconocidas. Uso menos aplicado: estudios de diversidad de hongos.
 - Método: Análisis de ADN por secuenciación y comparación con bases de datos de secuencias disponibles en internet (Genbank, UNITE).

Diseño experimental

2 grupos de árboles según carácter productor y 3 según edad

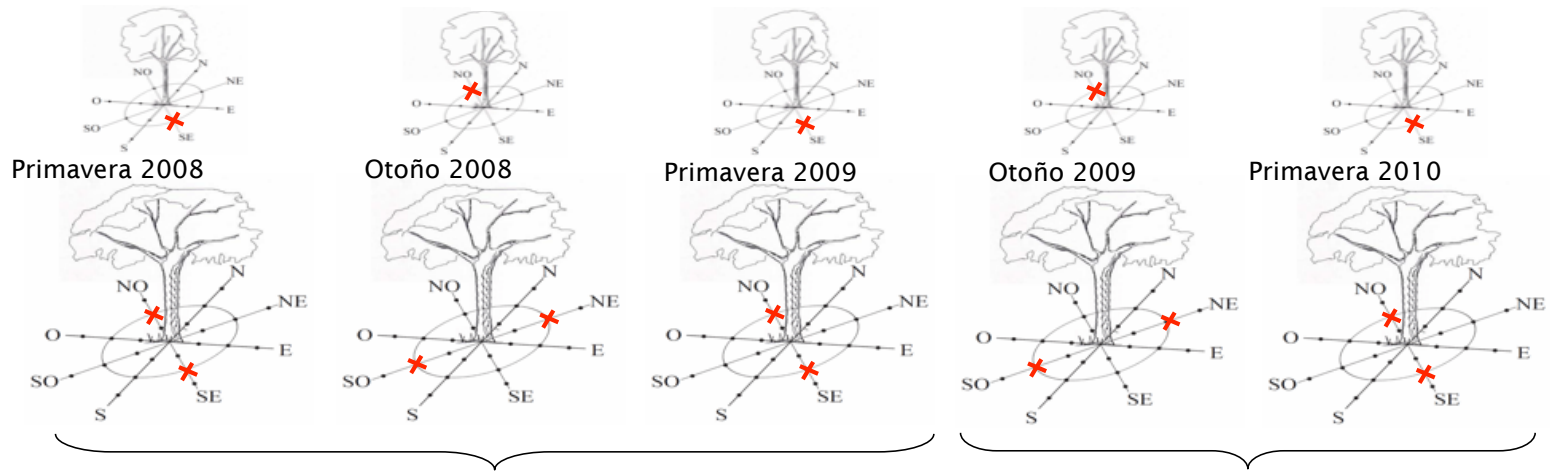
24: Productive {
 8: < 6 years
 8: 6-9 years
 8: > 9 years

24: Not productive {
 8: < 6 years
 8: 6-9 years
 8: > 9 years

< 6 años:

5 muestreos

≥ 6 años:



2 métodos de muestreo

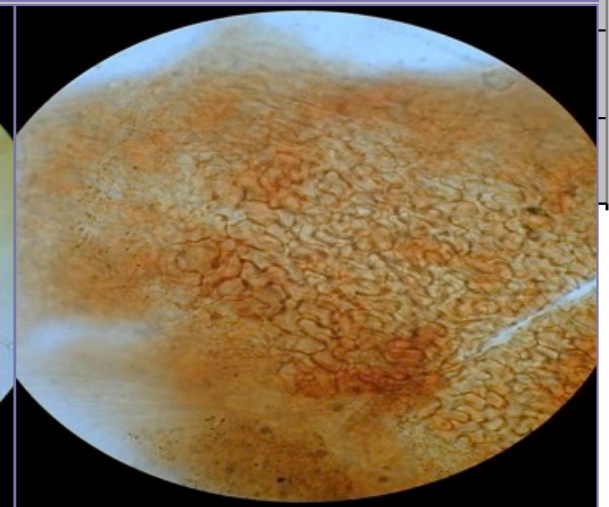
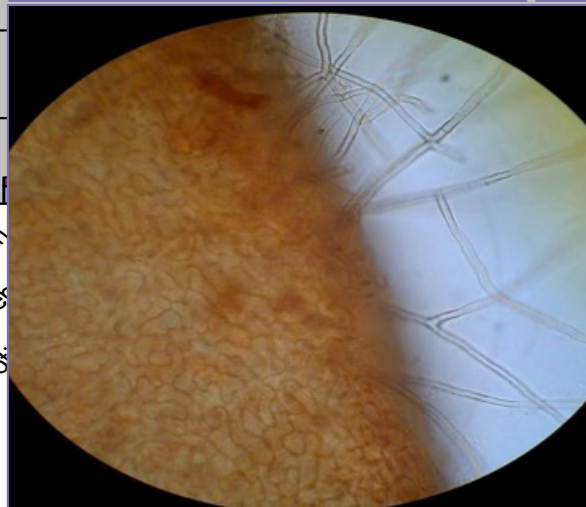
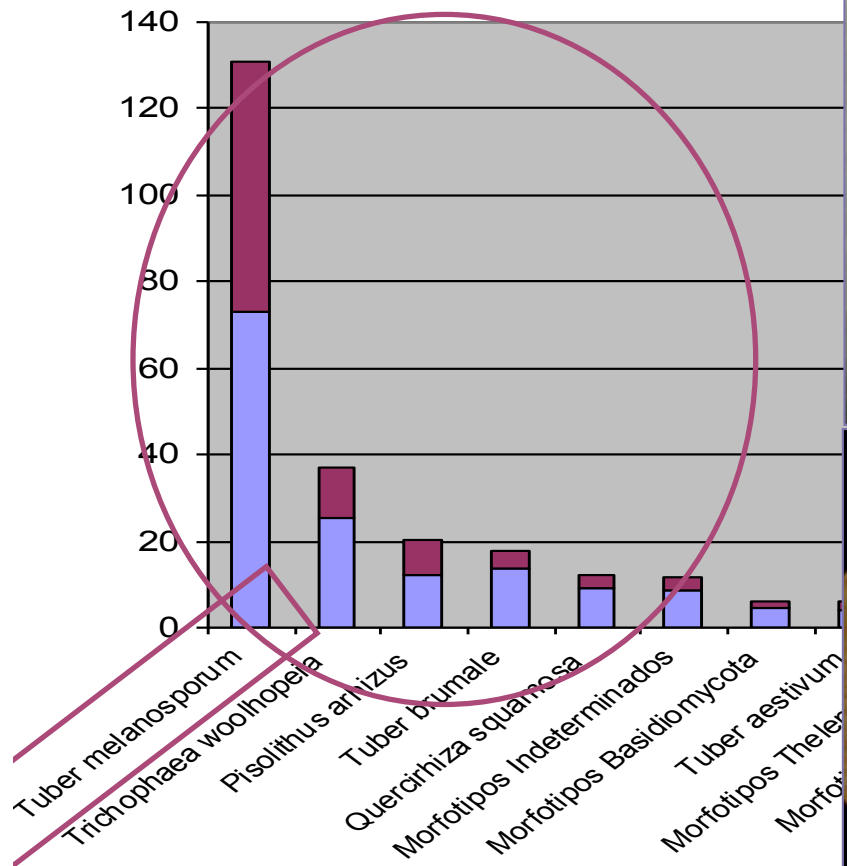


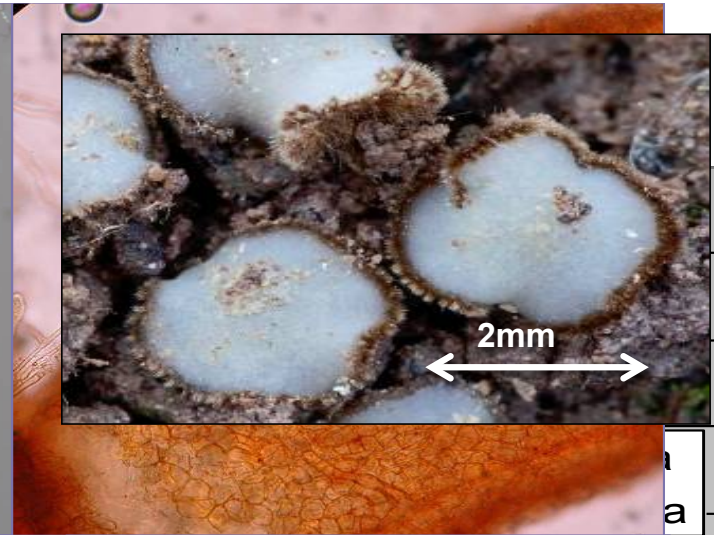
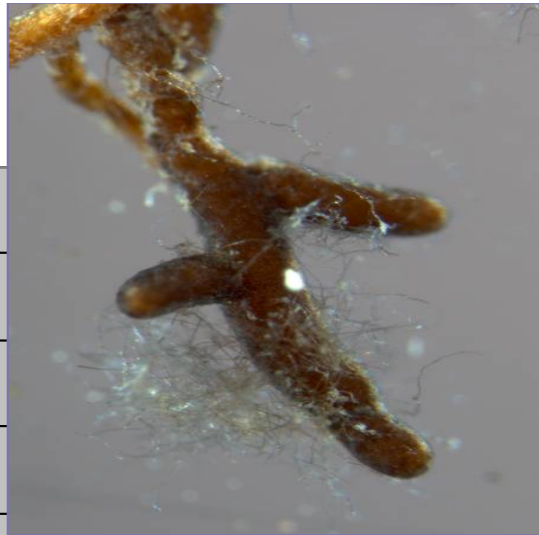
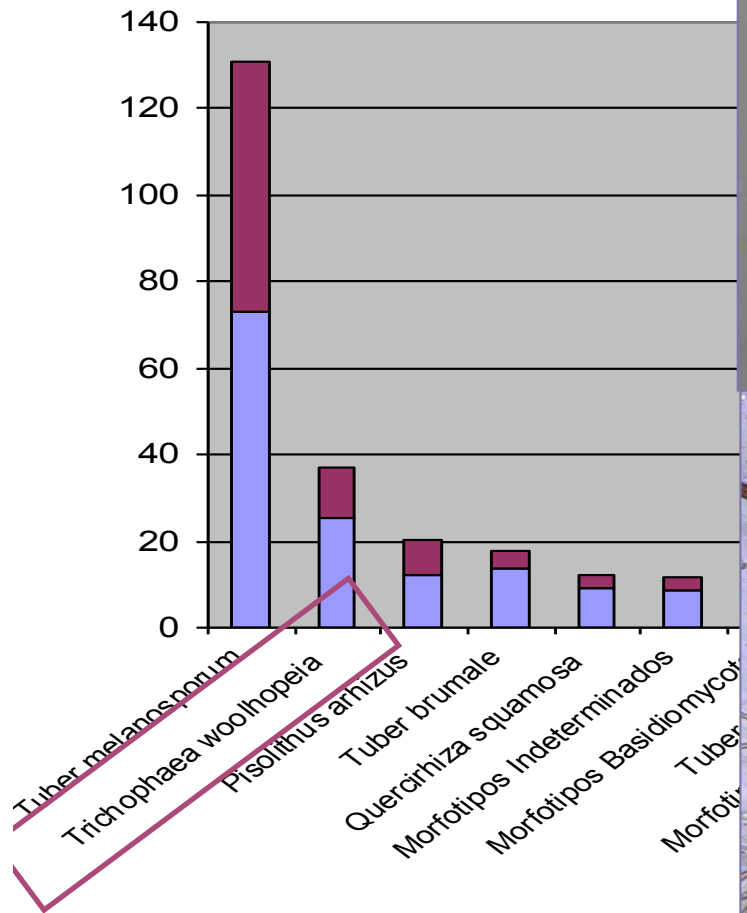
Direct extraction
 Total: 240 samples

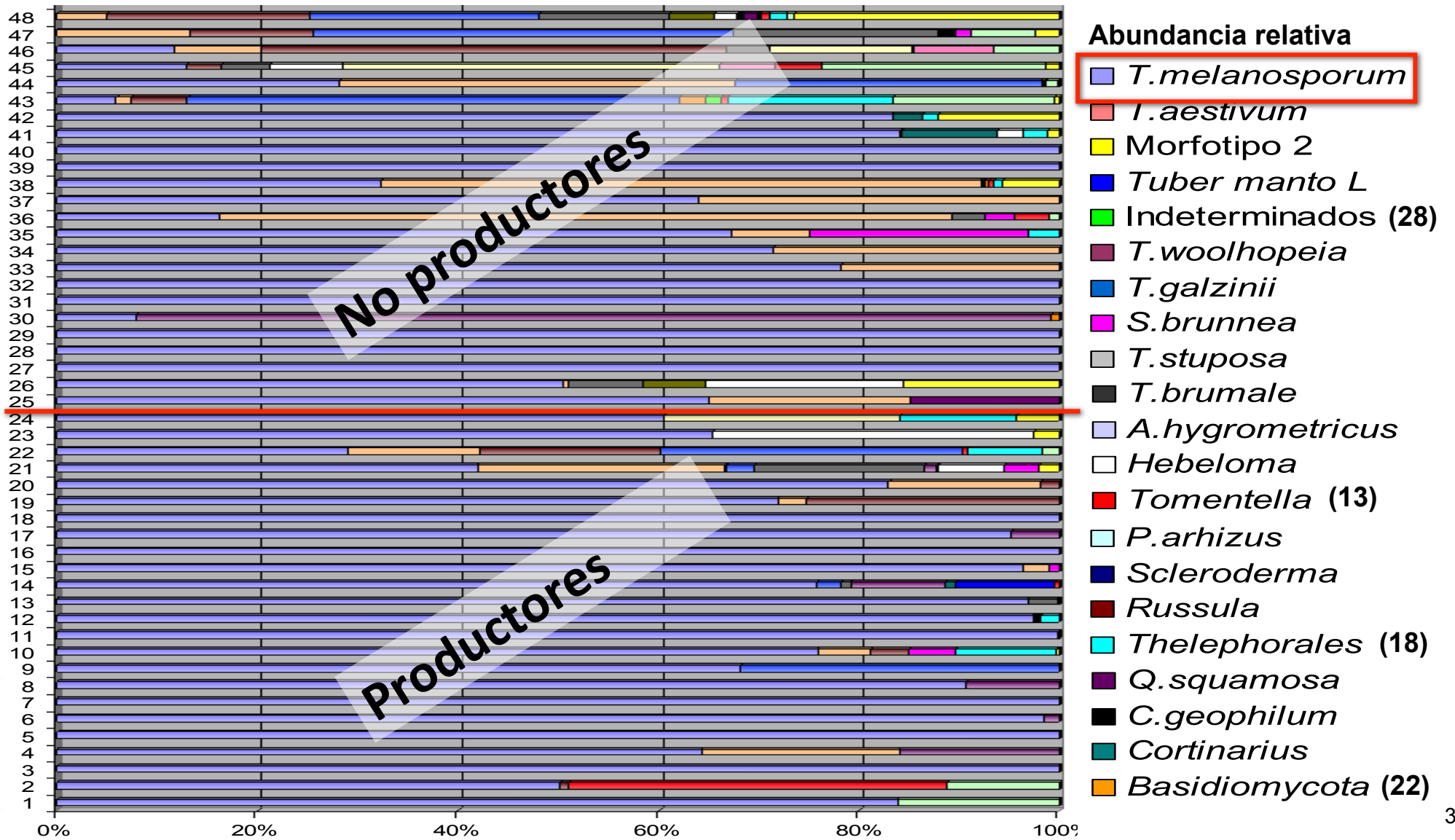


Soil cores
 Total: 160 samples









Tuber melanosporum

Árboles productores vs Árboles no productores:

Mayor porcentaje de micorrización por *Tuber melanosporum*, mayor densidad de micorrizas en el suelo y menor número de especies competidoras en los árboles productores

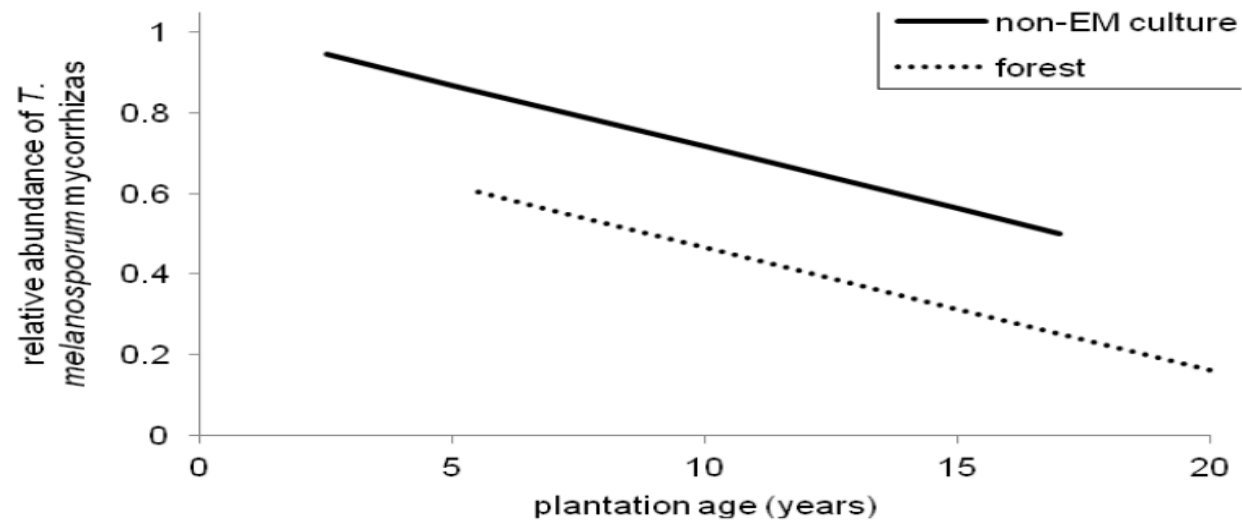
Trees	Abundance (% micorrization) Mean of 400 samples	ECM Density (Mycorrhizae per litre of soil)
Productive	80,5(±33,1) a	243,7(±273,1)
Not productive	50,5(±45,4) b	201,2(±315,7)
	<i>P</i> = 0,000	<i>P</i> = 0,062

En función de la edad del árbol:

Mayor porcentaje de micorrización por *Tuber melanosporum* y menor número de especies los árboles más jóvenes

Trees	Species richness (mean per sample)	Relative abundance (mean per sample)
< 6 years	1,5 (±1,1) a	80,3(±38,1) a
6-9 years	1,9(±1,1) b	74,0(±37,6) b
> 9 years	3,1(±1,9) c	48,9(±44,4) c
	<i>p</i> =0,000	<i>p</i> =0,000

Figure 3. Predicted effect of plantation age and former land use on the relative abundance of *T. melanosporum* mycorrhizas. The remaining predictor variables are fixed at mean values.



Detección de *Tuber melanosporum*

Probabilidades de detectar sus micorrizas en plantaciones homogéneas

Number of samples per tree	Number of trees					
	1	2	3	4	5	6
1	0,704	0,912	0,974	0,992	0,998	0,999
2	0,882	0,986	0,998	1,000	1,000	1,000
3	0,937	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000
4	0,969	0,999	1,0	1,0	1,0	1,0
5	0,987	1,000	1,0	1,0	1,0	1,0
6	0,993	1,000	1,0	1,0	1,0	1,0
7	0,994	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means of probability obtained from several randomizations. Standard deviation was deducted to underestimate.

Primera opción sobre 95%
= menor número de muestras para alcanzarla

Testing this results in 42 productive plantations ≥ 10 years with soil cores:

Probability distribution of detections	Number of samples		
	1	2	3
Estimated in this work	0,704	0,912	0,974
Observed	0,738	0,881	0,952

Muy similares

Basta analizar las micorrizas de 3 muestras recogidas en 3 árboles diferentes de cada lote plantado. Si se localizan sus micorrizas: no se asegura nada, pero puede haber producción en el futuro. Si no se localizan: posiblemente la parcela no produzca nunca si no se hace algún tipo de intervención.

Comparación métodos de muestreo

Directo	Cilindros	U	<i>p</i>
1,6 (±0,9)	2,2 (±1,6)	27741	0,000

**El método directo encuentra menos riqueza específica
no tan válido para estudios exhaustivos**

Morfotipo	N	Frecuencias de aparición		Valor χ^2	<i>p</i>
		En muestreo directo	En muestreo cilindros		
<i>Tuber melanosporum</i>	46	78,3%	84,7%	2,378	0,123
<i>Trichophaea woolhopeia</i>	22	25,7%	27,8%	0,206	0,650
<i>Tuber brumale</i>	12	9,6%	20,1%	8,407	0,004
<i>Quercirhiza squamosa</i>	11	4,3%	9,0%	3,361	0,067
<i>Pisolithus arhizus</i>	9	10,9%	14,6%	1,132	0,287
Morfotipo <i>Russula</i>	8	2,2%	6,3%	4,083	0,043
Morfotipo <i>Scleroderma</i>	7	1,3%	3,5%	1,087	0,297
<i>Tuber aestivum</i>	7	2,6%	2,8%	0,000	1,000
<i>Astraeus hygrometricus</i>	6	1,3%	3,5%	1,087	0,297
<i>Cenococcum geophilum</i>	5	0,9%	4,2%	3,159	0,076
Morfotipo <i>Hebeloma</i>	4	2,2%	4,2%	0,633	0,426
Morfotipo <i>Cortinarius</i>	2	0,4%	3,5%	3,430	0,064
<i>Tomentella galzinii</i>	2	1,3%	2,1%	0,026	0,872
MUESTRAS TOTALES		230	144		

**Detecta por igual los morfotipos mayoritarios
válido para diagnósticos de estado de micorrización**

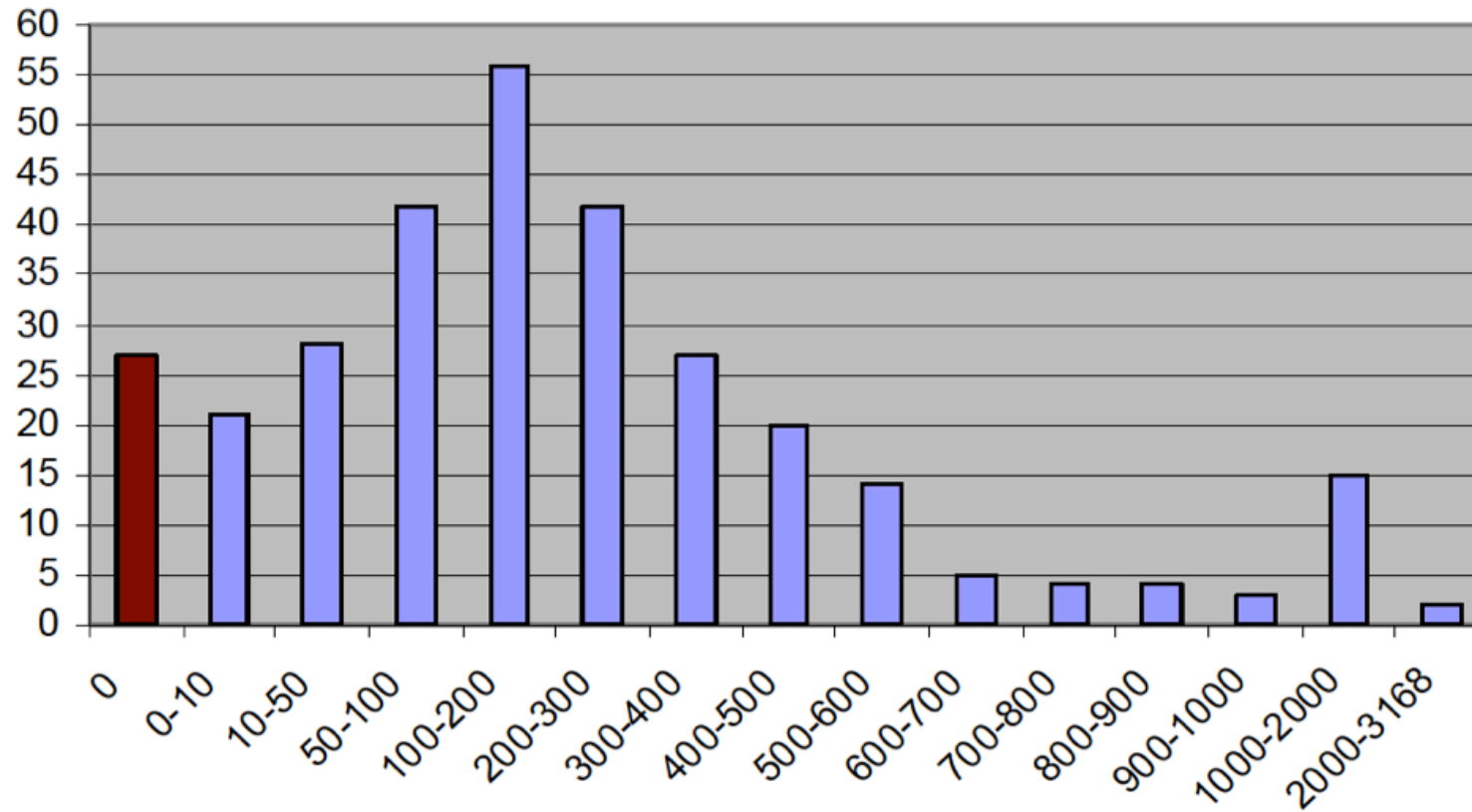


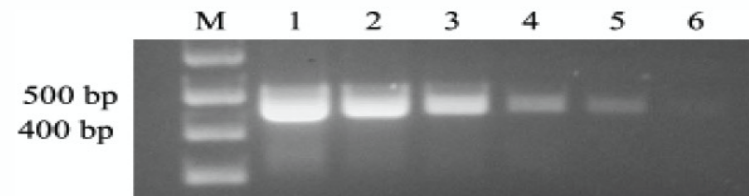
Figura I.27.- Número de cilindros de suelo (ordenadas) que contenían un número de ECM encuadrado dentro de cada intervalo (abscisas).

Alternativa al análisis de micorrizas: análisis de micelio extraradical

- Pioneros en detección de micelio de trufa negra en suelo: grupo de Lérida y Solsona.
- Aplicación de la cuantificación: PCR cuantitativa. Grupo del IRTA.
- Estos métodos aún no son aplicables de modo práctico porque cuesta interpretar aún sus resultados.
- Aún falta establecer:
Correspondencia con densidad de micorrizas
Correspondencia con producción

Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil

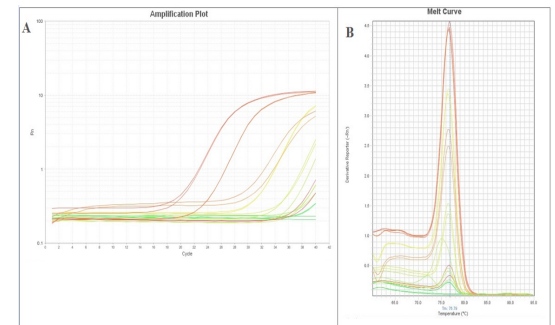
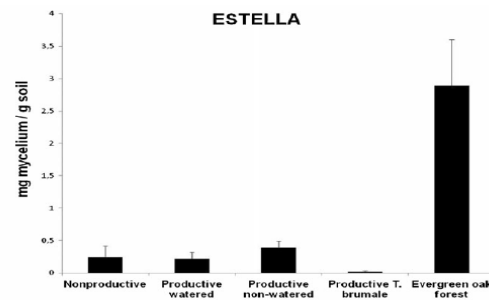
Laura M. Suz¹, María P. Martín², & Carlos Colinas¹
FEMS Microbiol Lett **254** (2006) 251–257



Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain

Mycorrhiza (2013) 23:99–106

Javier Parladé · Herminia De la Varga ·
Ana Ma. De Miguel · Raimundo Sáez · Joan Pera



Factores que afectan a la presencia de especies competidoras

- Cultivo precedente: ecto>endomicorrícico. Paradójicamente no truferas (Ojo con aplicar suelo de truferas silvestres a las plantaciones).
Relación con la distancia a masas forestales:
“efecto linde”.
- Hospedantes: Avellano>quejigo>encina.
Velocidad de crecimiento radicular.
- Edad: + edad + hongos.
- Manejo: efectos aún por esclarecer.
Hipótesis:
Frecuencia de poda: afecta negativamente a ciertos hongos: *T. woolhopeia*, *T. aestivum*.
Laboreo: efectivo contra especies con rizomorfos potentes.
- Otros factores: aún desconocidos...

Conclusiones

- ✓ *Tuber melanosporum* es capaz de persistir durante muchos años en las plantaciones, independientemente de haber comenzado la producción de trufas.
- ✓ *Tuber melanosporum* tiene una gran necesidad de ser la especie dominante de la comunidad de hongos de las raíces para producir trufas. Por este motivo es tan rápida y fácilmente detectable en plantaciones correctamente establecidas.
- ✓ Su ausencia en los análisis (al menos en niveles aceptables) puede también comprobarse fácilmente e interpretarse como un signo de fracaso de una plantación trufera.
- ✓ Se recomienda, por tanto, realizar este tipo de análisis para comprobar si las micorrizas persisten en las plantas si no se desea esperar a la aparición de quemados, o a la propia producción, para saberlo. También sería un modo inmediato de comprobar si algún “experimento casero” ha funcionado o no.
- ✓ Resumiendo, para detectar la presencia de *Tuber melanosporum*: Analizar 3 muestras, una por árbol, en tres árboles diferentes seleccionados al azar, a la altura de la proyección de la copa, en primavera u otoño, a partir del tercer año de plantación.

Conclusiones

- ✓ Los hongos competidores son parte integrante del ecosistema trufero y por su condición subterránea son difíciles de gestionar. Aparecen incluso en árboles productores. Su presencia no debe preocupar siempre y cuando dominen las micorrizas de trufa.
- ✓ Aún así, los hongos que compiten con la trufa, al igual que las malas hierbas de los cultivos herbáceos, seguramente juegan un papel crucial en la producción trufera.
- ✓ Consejo: cualquier seta es potencialmente dañina, sacarlas (en bolsa) fuera de las plantaciones.
- ✓ Aunque se han detectado hasta 100 especies diferentes en plantaciones truferas, las más frecuentes y en las que habría que centrar los esfuerzos de investigación no son más de 10. Destacando, por encima de todas, *Trichophaea woolhopeia* (anterior morfotipo AD).
- ✓ Los análisis de ADN, a nivel de rutina en certificación de planta de vivero y para solucionar dudas de micorrizas concretas en campo, son absolutamente necesarios.



Control y evaluación de plantaciones trufieras

Sergio Sánchez Durán
ssanchezd@aragon.es

