



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Primera evidencia de éxito de la micorrización con trufa de verano (*Tuber aestivum*) en una dehesa adulta

MEDIAVILLA, O.¹, OLAIZOLA SUÁREZ, J.¹, SANTOS-DEL-BLANCO, L.¹, SANTA-REGINA, I.², PEIX, A.², IGUAL, J.M.², HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.¹ y FRANCO MANCHÓN, I.¹

¹ID Forest - Biotecnología Forestal Aplicada, S.L.

²Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) – CSIC.

Resumen

La dehesa es un sistema silvopastoral que en las últimas décadas está sufriendo unas mermas en términos productivos por diversos motivos fitopatológicos. Uno de ellos, es la seca de la encina. Pese a que los remedios frente a esta enfermedad son limitados, las enmiendas calizas parecen evidenciar una posible forma de control. En otros contextos, la micorrización con diversas especies de hongos ectomicorrícos también ha sido efectiva en el control de otras enfermedades. Por ello, dentro del Proyecto LIFE Regenerate (LIFE16 ENV/ES/000276) se propuso la inoculación de la trufa de verano (*Tuber aestivum*), tras realizar una enmienda caliza. Ésta tuvo lugar en un encinar adehesado sano de la finca Muñovela, perteneciente al IRNASA-CSIC (Salamanca), para conseguir un doble objetivo: mejorar el estado sanitario y revalorizar la productividad de este sistema silvopastoral mediante la producción de trufa. A los dos años de la inoculación, se tomaron muestras de raíces en diversos puntos de las encinas inoculadas, pudiéndose encontrar ya micorrizas de *T. aestivum*. Esta es la primera evidencia conocida de éxito de inoculación con *T. aestivum* en este ecosistema. Este hito, acompañado de un posterior seguimiento abre la puerta a poder demostrar la posibilidad de producción de *T. aestivum* en la dehesa.

Palabras clave

Dehesa, encina, trufa de verano, inoculación, micorriza.

1. Introducción

La totalidad de los árboles que forman las principales masas boscosas de España (pináceas y fagáceas) establecen un tipo de simbiosis con ciertos grupos de hongos conocida como simbiosis ectomicorríca. Mediante esta relación simbiótica, el árbol se beneficia de una mayor captación de recursos y protección frente a patógenos (VAN DER HEIJDEN ET AL., 2015). Por su parte, el hongo se beneficia al obtener carbohidratos de su huésped. Esta interacción se produce de forma física en lo que se conoce como (ecto)micorriza. En la rizosfera de un mismo árbol, pueden convivir numerosas especies de hongos ectomicorrícos. Existen además cambios a lo largo de las etapas de desarrollo de la vida del árbol, de forma que algunas especies son propias de etapas tempranas y otras de etapas maduras o incluso tardías (ORIA DE RUEDA ET AL., 2007).

La asociación entre hongos productores de trufas y diversas fagáceas es un caso paradigmático de asociación ectomicorríca por su importancia económica. En la actualidad, existen el conocimiento y técnicas necesarias para el cultivo de trufas, que van desde la producción de planta micorrizada en vivero, a la preparación del terreno y los cuidados y manejo específicos para promover la fructificación de estos hongos. El éxito de una plantación trufera está fuertemente ligado a la ausencia de hongos que puedan desplazar al hongo productor de trufas. Por lo tanto, el establecimiento de plantaciones en parcelas libres de inóculo de hongos contaminantes es un requisito que se considera prácticamente imprescindible (DONNINI ET AL., 2014).

La inoculación con esporas de hongos productores de trufas de árboles adultos en cuya rizosfera ya se encuentren alojadas otras especies de hongos ectomicorrícos es, a priori una empresa con pocas garantías de éxito y sobre la que existe muy escasa información y poco actualizada (REYNA ET AL., 2001; MORCILLO ET AL., 2007). A pesar de ello, existen en el mercado productos encaminados precisamente a la inoculación de árboles adultos, tanto para la producción de trufas como de otros hongos ecomicorrícos como *Boletus edulis* o *Lactarius deliciosus*, principalmente.

Las principales especies de hongos productores de trufa comestible en España son la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y la trufa blanca de verano o trufa de San Juan (*Tuber aestivum*). Ambas tienen requerimientos ecológicos parcialmente solapantes, siendo una característica común la necesidad de suelos con pH básico y presencia de caliza. Aproximadamente la mitad occidental de la Península Ibérica alberga suelos con pH neutro o ácido, y las mencionadas especies de trufa no aparecen de forma natural (REYNA, 2012).

Siendo el bajo pH el principal motivo para la ausencia de especies de trufa en esta zona, planteamos la posibilidad de realizar una enmienda caliza que elevara el pH en una dehesa que por lo demás, tuviera características favorables para la producción de trufa de verano. Las enmiendas calizas en plantaciones truferas son comunes en ciertas zonas productoras ej. Nueva Zelanda, pero se realizan previamente a la implantación (MORCILLO ET AL., 2015). Este cambio de pH en árboles adultos, tendría dos efectos, por un lado, perjudicaría a los hongos ya presentes en la rizosfera, putativamente adaptados a pHs bajos, y por otra parte, facilitaría el desarrollo de micorizas de trufa. La acción descrita se enmarca además en un proyecto con objetivos más amplios (Proyecto LIFE Regenerate (LIFE16 ENV/ES/000276), entre los que se encuentran la mejora del estado fitosanitario de los árboles, potencialmente afectados por la enfermedad de la seca.

2. Objetivos

El principal objetivo de este caso de estudio es el desarrollo de la simbiosis micorríctica entre encinas adultas en un agrosistema de dehesa y la trufa blanca de verano (*T. aestivum*). A largo plazo, se pretende desarrollar una metodología que permita la producción de este hongo en la dehesa, de forma que su explotación permita aumentar los rendimientos económicos que se obtienen en este agrosistema.

3. Metodología

Dentro del proyecto Proyecto LIFE Regenerate (LIFE16 ENV/ES/000276), se contó con una finca de estudio y experimentación consistente en un encinar adehesado en la finca Muñovela (Salamanca), perteneciente al IRNASA-CSIC. En concreto, esta finca está situada en el término municipal de Barbadillo (C.S.I.C., 40°54'00"N, 5°45'30"W) (Salamanca).

En esta finca se seleccionaron 25 pies de *Quercus ilex* subsp. *ballota* maduros para efectuar las inoculaciones. Se evaluó visualmente el estado sanitario de los pies y se determinó que ambas zonas presentaban un estado fitosanitario bueno, sin pérdida de masa foliar ni síntomas ni daños por organismos nocivos. Se midió la altura de los pies, y se pudo observar que la altura media era de 7,5 m y el diámetro normal medio de 31,5 cm.

El sitio de estudio está situado a 830 m de altitud sobre el nivel del mar. En cuanto a las precipitaciones, cuenta con un aporte anual cercano a los 500 mm y una temperatura media de 11,8 °C. En relación a los diagramas ombrotérmicos de Bagnouls y Gausseen, la zona de estudio presenta un número de días secos efectivos entre 100 y 125, por lo que el clima se define como

termo-mediterráneo atenuado y en función de los parámetros climáticos fundamentales de precipitación y temperatura media anual se añaden los calificativos de semiárido.

El suelo del sitio de estudio se desarrolla principalmente sobre sedimentos del Mioceno Medio que incluyen conglomerados rojos (roca sedimentaria clástica de grano grueso) incrustados en una matriz muy rica en arcilla. Los clastos son de muy distinta naturaleza: cuarzo, cuarcita y esquisto. Es por ello, que el suelo se clasifica como Arenoso Franco, en cuanto a la textura. Este suelo es de carácter ácido con un pH de 6,6. En ellos hay una ausencia total de carbonatos. Además, son pobres en materia orgánica y nitrógeno, con contenidos también bajos de fósforo asimilable, y contenidos moderados de potasio y calcio fácilmente asimilables.

Para alcanzar un pH compatible con el desarrollo de *T. aestivum* (7,41) (ZAMBONELLI, 2016) en noviembre de 2017, el personal del IRNASA-CSIC procedió a aplicar carbonato cálcico en polvo mediante una abonadora centrífuga. Con el fin de no causar daños en el suelo por una sobreexposición del pH, se siguió la metodología de cálculo (CAMPILLO, 2013) para alcanzar el pH deseado. Por ello, se aplicó el equivalente a 1.3 t/ha en el área de influencia de la rizosfera de los pies seleccionados.

En marzo de 2018 se comprobó que el pH del suelo era de 7,42 y por ello se procedió a ejecutar las inoculaciones. Esta tarea se realizó en abril de 2018. Para ello, se fueron realizando 41 huecos con una barrena helicoidal de 30 cm de diámetro impulsada por la toma de fuerza de un tractor de 120 CV. La profundidad de los hoyos fue de unos 35 cm de profundidad. La ubicación de los hoyos estuvo siempre por debajo de la proyección de la copa de los árboles a unos 1.5-2 m de distancia del tronco (Figura 1). Cada hoyo se llenó con 5 L de sustrato optimizado de trufa de verano (*T. aestivum*), inóculo esporal de trufa de verano (el equivalente a 3 g de trufa fresca madura) y 4 mL de bacterias promotoras de la micorrización (*Pseudomonas fluorescens* – cepa IDF206) desarrolladas por la empresa ID Forest, a una concentración de 5×10^6 UFC/mL. Todo ello se mezcló con un 20 % de la tierra natural extraída al hacer el hoyo. Para evitar que estos puntos de inoculación fueran dañados por jabalíes o ganado doméstico, se colocó una malla de acero con un paso de 50x50 mm y 4 mm de diámetro, sobre la mezcla de inóculos y se cubrió con tierra natural para evitar accidentes. Estos puntos de inoculación se señalizaron con varillas de fibra de vidrio blancas clavadas de forma vertical. El mantenimiento de estos puntos de inoculación consistió en efectuar riegos de 30 L/punto de inoculación cuando había más de 3 semanas sin precipitaciones, a lo largo de 2018 y 2019.

Para la evaluación del estado de la micorrización, se tomaron 10 muestras (Figura 2). Esta toma de muestras se efectuó en febrero de 2020 y consistió en la búsqueda y recogida de todas las raíces finas (1-3 mm) que guardaban similitud con las *Q. ilex*, portadoras de ápices potencialmente micorrizables. Estas raíces fueron colocadas en bolsas adecuadamente etiquetadas, y fueron llevadas al laboratorio de IDForest.

De cada muestra individual tomada en campo, se extrajeron las micorrizas de forma manual y éstas fueron observadas bajo la lupa binocular. Para cada muestra, se clasificaron las micorrizas según su morfología compatible o no con la micorriza de *T. aestivum*. En particular, las micorrizas que forma *T. aestivum* con la encina son muy características: son escasamente ramificadas, de manto poligonal y con gran profusión de hifas que emanan del manto que son largas y curvas, de forma que dan un aspecto enmarañado a la micorriza.

4. Resultados

De las 10 muestras analizadas, se aislaron numerosas micorrizas en todas ellas. Los principales géneros observados fueron *Russula* y *Tricholoma*. En una de las muestras se observaron

micorrizas clasificadas como pertenecientes a *T. aestivum*, atendiendo a su morfología, manto poligonal y abundancia de hifas largas y curvas. En esta muestra, también se aislaron micorrizas de otras especies de hongos ectomicorrícos.

5. Discusión

En este caso de estudio se describe por primera vez la micorrización de árboles adultos de encina con trufa blanca de verano mediante una enmienda caliza y posterior inoculación localizada. Este es un resultado modesto, limitado por el momento al ámbito científico descriptivo. No obstante, este resultado puede abrir la puerta a, por un lado, técnicas de modificación de las condiciones del suelo que favorezcan o perjudiquen ciertas especies de hongos de interés, y por otro, a la producción de trufa blanca de verano en zonas fuera del rango de distribución natural de la especie.

Las diferentes especies de hongos del suelo, tanto micorrícos como patógenos, son sensibles a las condiciones edafoclimáticas (PÉREZ-IZQUIERDO ET AL., 2017). Es por ello que se ha propuesto la enmienda caliza como una forma de entorpecer el desarrollo de la enfermedad de la seca, que produce la muerte de ejemplares adultos de encinas y alcornoques en ecosistemas de dehesa. Este cambio en el pH del suelo permite, como así demuestra nuestro caso de estudio, la implantación de nuevas especies de hongos ectomicorrícos en la rizosfera. De forma análoga, la presencia de hongos contaminantes en plantaciones truferas productivas, podría también verse controlada o disminuida mediante tratamientos de reducción del pH con sulfatos o el uso de productos inhibidores del crecimiento de los hongos (MORCILLO ET AL., 2015). Tras constatar una reducción de las especies contaminantes, se procedería a restablecer los niveles de pH adecuados para la producción de trufa, junto con abundante inóculo esporal. Esta técnica podría tener interés en plantaciones truferas de *T. melanosporum* afectadas por la presencia de *T. brumale*, una especie de mucho menor valor económico.



Figura 1. Imagen bajo microscopio (200X) óptico de micorriza de *Tuber aestivum* asociada a encina (*Quercus ilex*) en una dehesa en Salamanca sobre la que se realizaron inoculaciones esporales.

En cuanto a la producción de trufa blanca de verano en suelo del occidente ibérico silíceo, cabe considerar varios escenarios. En primer lugar, en terrenos agrícolas de pH neutro o ácido, desprovistos de inóculo de hongos ectomicorrícos i.e. terrenos agrícolas dedicados al cultivo de cereal o leguminosas, y en los que el resto de requisitos edafoclimáticos sean favorables para el cultivo de la trufa, una enmienda caliza los convertiría adecuados para la instalación de

plantaciones truferas productivas, tanto de trufa negra como de trufa blanca de verano. Dada la mayor pluviometría estival del occidente ibérico respecto a muchas otras zonas del rango de distribución natural de las trufas negra y blanca de verano, una enmienda caliza permitiría la producción de estos hongos con menores costes de producción que allí donde se necesitan riegos de apoyo en verano (SÁNCHEZ ET AL., 2016). El presente caso de estudio confirma que el hongo de la trufa blanca de verano puede adaptarse y formar micorrizas con encinas en tales condiciones.

6. Conclusiones

Con esta experiencia se demuestra la posibilidad de introducir una especie con requerimientos de pH neutro o alcalino y presencia de carbonato como es la trufa blanca de verano, *Tuber aestivum*, en el suelo en una zona de suelo ácido y ausencia de carbonatos. Se trata además de uno de los muy pocos ejemplos disponibles de inoculación exitosa de una especie de hongo ectomicorrícico sobre árboles maduros.

7. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto LIFE16 ENV/ES/000276 'Revitalizing multifunctional Mediterranean agrosilvopastoral systems using dynamic and profitable operational practices. LIFE REGENERATE', Unión Europea.

8. Bibliografía

- CAMPILLO, R.; 2013. Estrategias de corrección de suelos acidificados mediante enmiendas calcáreas. *Boletín INIA - Inst Investig Agropecu* 281: 7–22.
- DONNINI, D.; BENUCCI, G.; BENCIVENGA, M.; BACIARELLI-FALINI, L; 2014. Quality assessment of truffle-inoculated seedlings in Italy: Proposing revised parameters for certification. *For Syst* 23: 385–393.
- VAN DER HEIJDEN, MGA.; MARTIN, F.; SELOSSE, M-A.; SANDERS, IR; 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205: 1406–1423.
- MORCILLO, M.; SÁNCHEZ, M.; JOSEP, M.; ENRIC, G.; VIDAL C.; 2007. Inoculación de avellanos con *Tuber brumale* y *Tuber melanosporum* Vitt. En: 1st World conference on the Conservation and Sustainable Use of Wild Fungi. Córdoba, España.
- MORCILLO, M.; SÁNCHEZ, M.; VILANOVA, X; 2015. Truffle farming today. *Micología Forestal Aplicada*, 352 pp. Barcelona, España.
- ORIA DE RUEDA, JA.; GARCÍA, C.; MARTÍN PINTO, P.; MARTÍNEZ DE AZAGRA, A.; OLAIZOLA, J.; DE LA PARRA, B.; FRAILE FABERO, R.; ÁLVAREZ-NIETO, A; 2007. Hongos y setas. *Tesoro de nuestros montes*. Cálamo, 280 pp, Palencia, España.
- PÉREZ-IZQUIERDO, L.; ZABAL-AGUIRRE, M.; FLORES-RENTERÍA, D.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.; BUÉE, M.; RINCÓN, A; 2017. Functional outcomes of fungal community shifts driven by tree genotype and spatial-temporal factors in Mediterranean pine forests. *Environ Microbiol*: 1–38.
- REYNA, S; 2012. Truficultura: fundamentos y técnicas. MundiPrensa, 712 pp, Madrid,

España.

REYNA, S.; BARREAL, JAR.; FOLCH, L.; DOMINGUEZ, A.; SAIZ-DE-OMECAÑA, J.; ZAZO, J; 2001. Técnicas de inoculación de árboles adultos con *Tuber melanosporum* Vitt. En: III Congreso Forestal Español. Granada, España.

SÁNCHEZ, S.; DE MIGUEL, AM.; SÁEZ, R.; MARTÍN-SANTAFÉ, M.; ÁGUEDA, B.; BARRIUSO, J.; GARCÍA-BARREDA, S.; SALVADOR-ALCALDE, D.; REYNA, S; 2016. La trufa de verano en la península ibérica: estado actual y potencialidad de cultivo. *Inf Tec Econ Agrar* 112: 1-14.

ZAMBONELLI, A; 2016. True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry. 436 pp.