

## Trabajo Fin de Máster

Análisis comparativo de los métodos utilizados para la evaluación de la calidad de la planta de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.)

Autor

Antonio C. Andrés Alpuente

Directores

Sergio Sánchez Duran

Javier A. Aguirre De Juana

Escuela Politécnica Superior de Huesca

2013



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Juan José Barriuso Vargas por darme la oportunidad de trabajar en su equipo y por su disposición en toda esta andadura trufícola.

Al Doctor Sergio Sánchez Durán y al Doctor Javier Aguirre de Juana, Directores de este proyecto, por su ejemplo constante de buen humor, trabajo, complicidad y esfuerzo.

A mis compañeros de trabajo, Laura, Sandra, Karina, Vittus, Nacho, María y Pablo.

A la Doctora Cristine Fischer por su disposición en aleccionarme en su metodología.

A los viveristas que han participado en este proyecto con sus plantas.

A mis amigos. Manu, con quien siempre me meto en algún “fregao” y siempre salimos victoriosos. A Afif por los mail urgentes precongreso y por su complicidad investigadora. A Jorge Málaga por esos ratos deportivos y festivos.

A la Escuela de Movera por su disposición a colaborar con mis estudios.

A mi familia por estar siempre ahí, para lo que haga falta.



# ÍNDICE

## RESUMEN / ABSTRACT / RIASSUNTO / RESUME

	Pág.
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- La Trufa</b>	<b>1</b>
1.1.1.- Taxonomía y morfología	1
1.1.2.- Ciclo biológico	9
1.1.3.- El cultivo de la trufa	10
<b>1.2.- La planta micorrizada y la evaluación de su calidad</b>	<b>13</b>
1.2.1.- La calidad forestal de la planta y su caracterización	16
1.2.2.- Posibles contaminantes en vivero	20
1.2.3.- Situación actual de la evaluación de planta micorrizada por <i>T. melanosporum</i> en Europa	24
<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1.- Diseño experimental	35
3.2.- Selección de viveros y muestreo de lotes	35
3.3.- Preparación de muestras y mediciones biométricas	38
3.4.- Procesos comunes a todos los métodos aplicados	41
3.5.- Evaluación de la planta de acuerdo a cada metodología	44
3.6.- Diseño del análisis estadístico	48
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
4.1.- Aptitud forestal y biométrica	51
4.2.- Aptitud micorrícica	56
4.2.1.- Porcentajes de micorrización de <i>T. melanosporum</i>	56

4.2.2.- Aptitud hongos contaminantes_____	62
<b>4.3.- Análisis del tiempo invertido en determinar el porcentaje de micorrización según los métodos estudiados_____</b>	<b>63</b>
<b>4.4.- Discusión de los diferentes métodos_____</b>	<b>64</b>
4.4.1.- Metodología CEAM-Valencia Reyna <i>et al.</i> (1997)_____	64
4.4.2.- Metodología INRA-ANVAR Chevalier <i>et al.</i> (1972)_____	65
4.4.3.- Metodología Universidad de Perugia Bencivenga <i>et al.</i> (1987)_____	66
4.4.4.- Metodología INIA-Aragón Palazón <i>et al.</i> (1999)_____	67
4.4.5.- Metodología Universidad de Lérida Fischer y Colinas (1996)_____	68
4.4.6.- Discusión general sobre los métodos utilizados_____	69
<b>5.- CONCLUSIONES_____</b>	<b>71</b>
<b>6.- BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA_____</b>	<b>73</b>
<b>ANEJO: Descripción de los principales métodos_____</b>	<b>79</b>
1. Metodología CEAM-Valencia, Reyna <i>et al.</i> (1997)_____	80
2. Metodología INRA-ANVAR, Chevalier <i>et al.</i> (1972)_____	85
3. Metodología Universidad de Perugia, Bencivenga <i>et al.</i> (1995)_____	89
4. Metodología INIA-Aragón, Palazón <i>et al.</i> (1999)_____	98
5. Metodología Universidad de Lérida, Fischer y Colinas (1996)_____	102

## RESUMEN

### **Análisis comparativo de los métodos utilizados para la evaluación de la calidad de la planta de encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.)**

La calidad de partida de la planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vittad. es uno de los factores principales que determinan el éxito o el fracaso de una plantación trufera. Asegurar ciertos niveles de calidad implica proteger al agricultor, el cual mantendrá dichas plantas durante gran cantidad de años en el campo si la evolución de la plantación es favorable. El flujo de este tipo de material entre los diferentes países de la UE e incluso de otros continentes aumenta cada vez con mayor rapidez, motivo por el cual debe trabajarse en la obtención de un método de certificación común. Existen 5 métodos más habituales, documentados y publicados para efectuar dicho control, 3 de ellos se emplean en diferentes regiones españolas y los otros dos en Francia e Italia. Todos ellos se basan en el establecimiento de un porcentaje de micorrización, aunque éste es calculado de diferente modo en cada uno de ellos. Alguno además, da una estimación del número total de micorrizas de la planta. La mayor parte de ellos son destructivos. Se evaluaron 12 plantas por lote, de 5 lotes pertenecientes a 2 viveros, empleando con cada una de ellas los 5 métodos de control de calidad antes mencionados. Además se midieron diferentes parámetros dasonómicos implicados en la calidad forestal del material vegetal y otros como el tiempo de análisis que requiere cada método. Se encontró una fuerte correlación entre los porcentajes de micorrización que proporciona cada método pero no en su capacidad de valorar la aptitud de cada uno de los lotes. Se proporciona una discusión sobre las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos y sobre las características que debería poseer una nueva metodología de control de planta micorrizada con trufa negra.

#### **Palabras clave**

*Tuber melanosporum*, *Quercus ilex*, micorrización, viveros, certificación

## ABSTRACT

### **Comparative analysis of the methods used for the evaluation of the quality of oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) mycorrhized with the black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.)**

Quality of plants mycorrhized with *Tuber melanosporum* Vittad. is one of the main factor involved in the success or failure of the truffle crop. Thus, acceptable quality level of those plants will be important for the farmer who keeps truffle crop for so many years. Mycorrhized plants flow has grown fast between European countries and even countries from different continents, for this reason an evaluation method shared for all of them is needed. Five evaluation methods are published and the most common; three of them are performed in Spain and the other two in France and Italy. All of them are based in the percentage of mycorrhization, but is evaluated differently in every method and one method estimates the total number of mycorrhizas. Most of them are destructive. Twelve plants for each batch and five batches from two nurseries were evaluated by the five methods above mentioned. Moreover, several biometric indicators of the forest quality were also analyzed as the time required for every method. We found a strong correlation between the percentages of mycorrhizal provided by each method but not in their ability to assess the suitability of each batch. We discuss the advantages and disadvantages for every method and which characteristic must have a new evaluation method for black truffle mycorrhized plants.

#### **Keywords**

*Quercus ilex*, *Tuber melanosporum*, certification, nurseries, mycorrhization

## RIASSUNTO

### **Analisi comparativo dei metodi utilizzati per la valutazione della qualità della pianta di quercia (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota*) micorrizati con tartufo nero (*Tuber melanosporum* Vittad.)**

La qualità della pianta micorrizata con *Tuber melanosporum* Vittad. è uno dei fattori principali che determinano il successo o il fallimento di una piantagione di tartufo. Garantire determinati livelli di qualità significa proteggere l'agricoltore, che manterrà le piante nel campo per molti anni se l'evoluzione della piantagione è favorevole. Il flusso di questo tipo di materiale tra i diversi paesi dell'UE e anche altri continenti aumenta sempre più rapidamente, ragione per cui è necessario lavorare per ottenere un metodo di certificazione comune. Esistono 5 metodi più abituali documentati e pubblicati per effettuare tale controllo, 3 di essi sono utilizzati in diverse regioni della Spagna e gli altri due in Francia e in Italia. Tutti si basano sullo stabilire una percentuale di micorrizzazione, anche se questa è calcolata in modi diversi in ciascuno di essi. Qualcuno di essi dà una stima del numero totale di micorrize della pianta. La maggior parte di loro sono distruttivi. Sono state analizzate 12 piante per ogni lotto di 5 lotti appartenenti a 2 vivai. Per ogni pianta sono stati impiegati i 5 suddetti metodi di controllo di qualità. Inoltre sono stati misurati i diversi parametri biometrici coinvolti nella qualità forestale del materiale vegetale ed altri come il tempo di analisi richiesto da ciascun metodo. Si è trovata una forte correlazione tra le percentuali di micorrizzazione che fornisce ogni metodo ma non nella capacità di valutare ciascuno dei lotti. Si fornisce una discussione sui vantaggi e gli svantaggi di ciascuno di metodi e sulle caratteristiche che dovrebbe avere una nuova metodologia per il controllo della pianta micorrizata con tartufo nero.

#### ***Parole chiave***

*Quercus ilex, Tuber melanosporum, certificazione, vivai, micorrizzazione*

## RESUME

### **Analyse comparative des méthodes utilisées pour l'évaluation de la qualité de chêne vert (*Quercus ilex* L. subsp *ballota*) mycorhizée à la truffe noire (*Tuber melanosporum* Vittad.)**

La qualité de la plante mycorhizée par *Tuber melanosporum* Vittad. est l'un des principaux facteurs qui déterminent le succès ou l'échec d'une plantation de truffe. Garantir que certains niveaux de qualité représente protéger l'agriculteur, qui garde ces plantes pendant plusieurs années dans ces champs si l'évolution de la plantation est favorable. Le commerce de ce type de matériel entre les différents pays de l'UE et même d'autres continents s'accroît toujours plus rapidement, raison pour laquelle on devrait travailler dans l'obtention d'une méthode commune de certification. Il y a 5 méthodes plus courantes, documentées et publiées pour effectuer ce contrôle. Trois d'entre elles sont utilisées dans différentes régions de l'Espagne et les deux autres en France et en Italie. Toutes reposent sur la mise en place d'un pourcentage de mycorhization, même si elle est calculée de façon différente dans chacun d'eux. Certains donnent une estimation du nombre total des plants mycorhizés. La plupart est destructive. Ils ont été évalués 12 plantes pour chaque lot de 5 lots appartenant à 2 pépinières. Pour chaque plante nous avons utilisé les 5 méthodes de contrôle de qualité mentionnées ci-dessus. En outre, ils ont été mesurés les différents paramètres biométriques impliqués dans la qualité forestale du matériel végétal et d'autres comme le temps d'analyse requis par chaque méthode. Il a été trouvé une forte corrélation entre le pourcentage de mycorhization qui fournit chaque méthode mais non dans sa capacité à évaluer chacun des lots. On fournit une discussion sur les avantages et les inconvénients de chacun d'eux et les caractéristiques qui devraient avoir une nouvelle méthodologie pour le contrôle des végétaux mycorhizés à la truffe noire.

#### **Mots clés**

*Quercus ilex*, *Tuber melanosporum*, certification, pépinière, mycorhizienne

# 1. Introducción

## 1.1 La trufa

Bajo la denominación general de trufas se suele englobar a la mayor parte de los hongos hipogeos (que fructifican bajo tierra), siempre de formas más o menos globosas, muy aromáticos y generalmente comestibles. Sin embargo, la trufa por antonomasia es la trufa negra o trufa del Perigord (*Tuber melanosporum* Vittad.) es un hongo con un enorme aprecio en la cocina de calidad por su intenso, característico y persistente aroma.

En España *T. melanosporum* vive asociada de forma natural en simbiosis ectomicorrícica a la encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) (Fig.-1), el quejigo, (*Q. faginea* Lam.), la coscoja (*Q. coccifera* L.), el roble pubescente (*Q. pubescens* Willd.), el tilo (*Tilia platyphyllos* Scop.) y el avellano (*Corylus avellana* L.) (Etayo *et al*, 1999), e incluso con ciertas especies de jaras como *Cistus* L. y *Pinus* L. (Ventura *et al*. 2006).

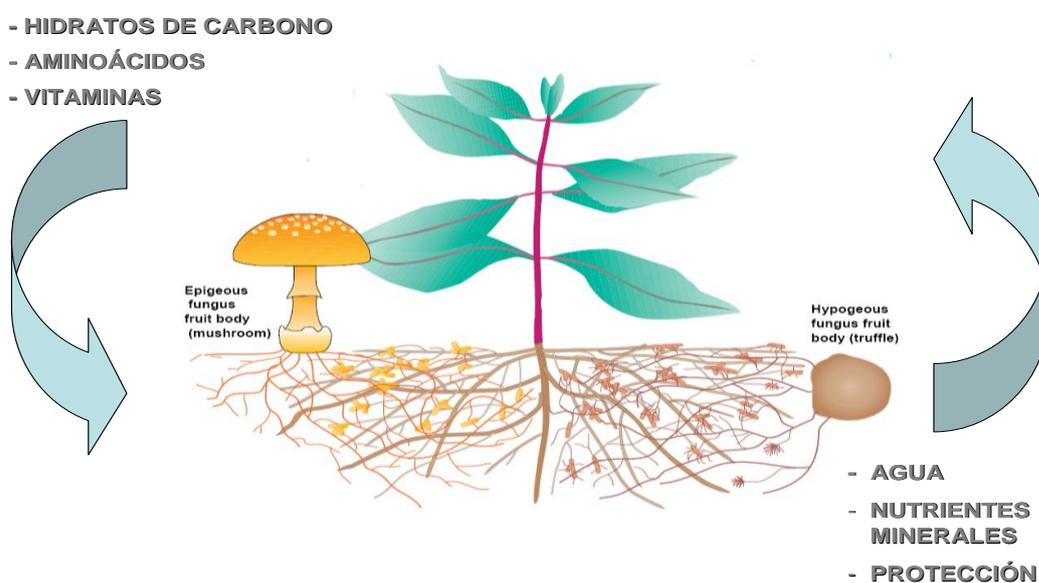


Fig.- 1 Esquema de los beneficios mutuos que obtienen los dos organismos en la simbiosis micorrícica. Modificado de Brundrett 2008.

### 1.1.1 Taxonomía y morfología

La especie *T. melanosporum* se encuadra dentro del género *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg., familia *Tuberaceae*, orden *Pezizales*, clase *Pezizomycetes*, división *Ascomycota*, reino *Fungi*.

## El carpóforo

El carpóforo o trufa (Fig.-2) es de forma globosa, algo irregular y a veces lobulada. Su tamaño es variable oscilando normalmente entre 3 y 12 centímetros de diámetro, ocasionalmente alcanzando tamaños mayores (Riousset *et al.* 2001). Está provisto de una capa más externa y dura (peridio) que protege a la parte interna (gleba), la cual está recorrida por unos pliegues que permiten la circulación de aire (venas).

Esta fructificación tiene el peridio negro brillante, a veces con algún tono rojizo marrón entre las hendiduras de las irregularidades, más frecuentemente en trufas inmaduras. El peridio es adherente y no se desprende fácilmente, como ocurre en otras especies con las que podría confundirse, como por ejemplo *Tuber brumale* Vittad. Posee verrugas poligonales de 3 a 5 mm de altura, deprimidas en su ápice y finamente estriadas (Montecchi y Sarasini, 2000) (Fig.-2).



**Fig.-2 Plato de trufas negras preparadas para su consumo en donde se puede apreciar su forma globosa. Detalle del peridio donde se aprecian las estructuras poligonales.**

La gleba en los individuos inmaduros es blanca (Fig.-3) y se va tornando oscura con la madurez, pasando de un gris más o menos tenue al marrón oscuro y al negro violáceo. Está recorrida por numerosas venas blancas o blanquecinas, finas y nítidas, que cuando alcanzan la sobremaduración acaban por desaparecer al adquirir el color del conjunto de la gleba. Las venas están muy ramificadas, abundantemente, dándole un aspecto mármreo (Fig.-3) (Montecchi y Sarasini, 2000). Está compuesta por micelio y esporas sexuales que están protegidas por las ascas.



Fig.-3 Carpóforo inmaduro de *T. melanosporum* donde se puede distinguir la gleba de color blanquecino. Carpóforo maduro de *T. melanosporum* donde se puede apreciar las venas de color blanco que lo recorren.

Las ascas son globosas y pedunculadas (Fig.-4), con dimensiones de 90-140 x 80-120  $\mu\text{m}$ . En su interior encierran de 1 a 6 esporas. Las ascosporas (Fig.-3) son opacas, marrones, ornamentadas con acúleos cortos y rígidos, recordando a los frutos de las plantas del género *Xanthium*. Su tamaño oscila entre estos valores: 29-35-55 x 22-26-35  $\mu\text{m}$  (Ceruti, 1960).

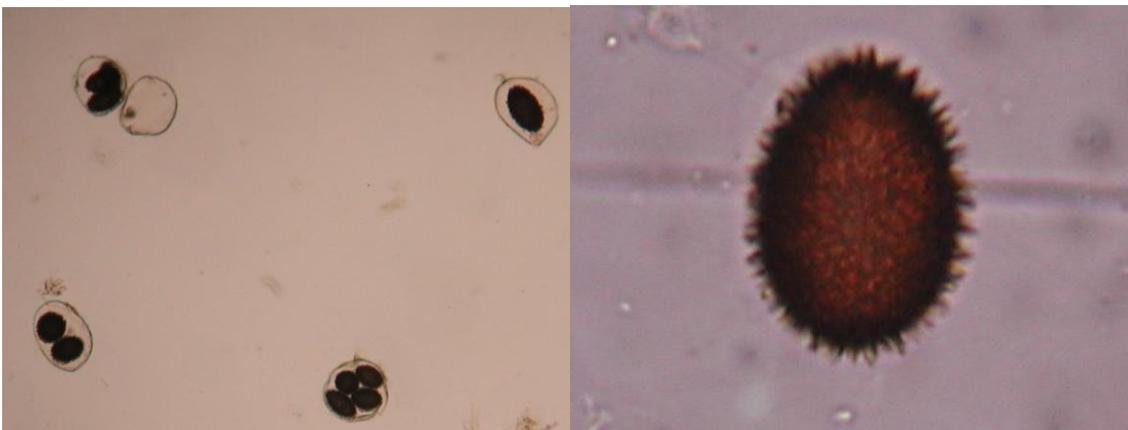


Fig.-4 Ascas con esporas de *T. melanosporum* vistas al microscopio. Espora de *T. melanosporum*.

### Micorrizas

La trufa está incluida en un grupo de hongos de tipo simbiote que necesitan asociarse a las raíces más finas de ciertas plantas superiores como las encinas, robles, coscojas, avellanos, etc. El resultado de esta asociación es un órgano mixto (hongo-raíz) que se llama micorriza.

Esta asociación da lugar a un beneficio mutuo, que se refleja en varios sentidos (Fig.-1), las hifas del hongo aumentan la superficie de absorción de las raíces,

proporcionando a la planta una mayor cantidad de agua y nutrientes, así como algunas sales minerales (fósforo principalmente). Esto conlleva un mayor crecimiento y supervivencia en campo de las plantas (Honrubia *et al.* 1992) así como mejoras en la tolerancia a situaciones de estrés como sequía, trasplantes o enfermedades. En este último caso también influye la barrera física que forma el hongo a la entrada de patógenos de raíz. En la fase de vivero propician un mejor crecimiento y acumulación de reservas que sitúan a la planta en mejor posición para la futura plantación. El hospedador, por su parte, cede al hongo parte de sus fotosintatos, sustancias que no podría sintetizar de otro modo. Además, únicamente estableciendo esta asociación, el hongo es capaz de culminar su reproducción sexual, produciendo los carpóforos.

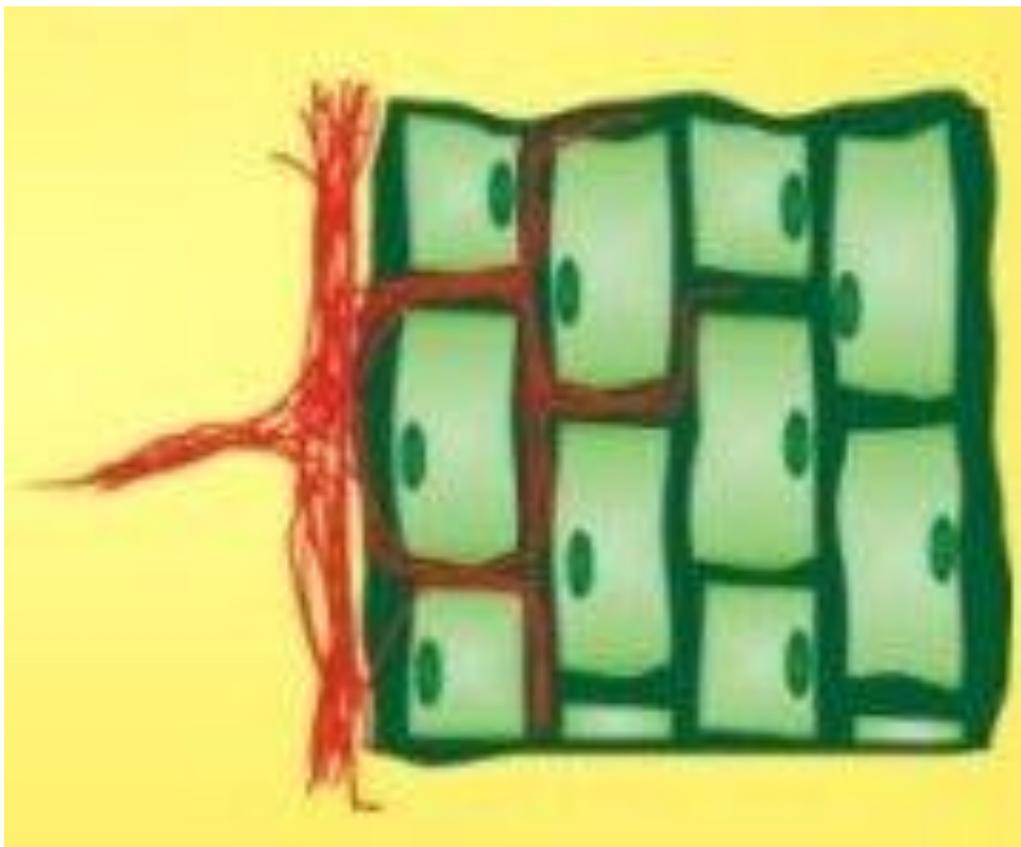
Las micorrizas están constituidas por una raicilla muy fina rodeada y penetrada en mayor o menor grado por el micelio del hongo. En función de hasta qué punto se produce esta fusión, las micorrizas se pueden dividir en tres tipos (Smith y Read, 2008): endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas. Las que forma el género *Tuber* con diferentes especies vegetales pertenecen al segundo tipo.

En el ámbito forestal arbolado de las zonas templadas las ectomicorrizas son la forma simbiótica más ampliamente extendida. Numerosas especies forestales forman este tipo de micorriza (Smith y Read, 2008), en unión a diversos hongos, muchos de ellos muy apreciados por su interés gastronómico como diversas especies de los géneros *Lactarius* Pers., *Boletus* Tourn. ex Adans., *Russula* Pers., *Amanita* Dill. ex Boehm *Cantharellus* Adans. ex Fr., además de *Tuber*.

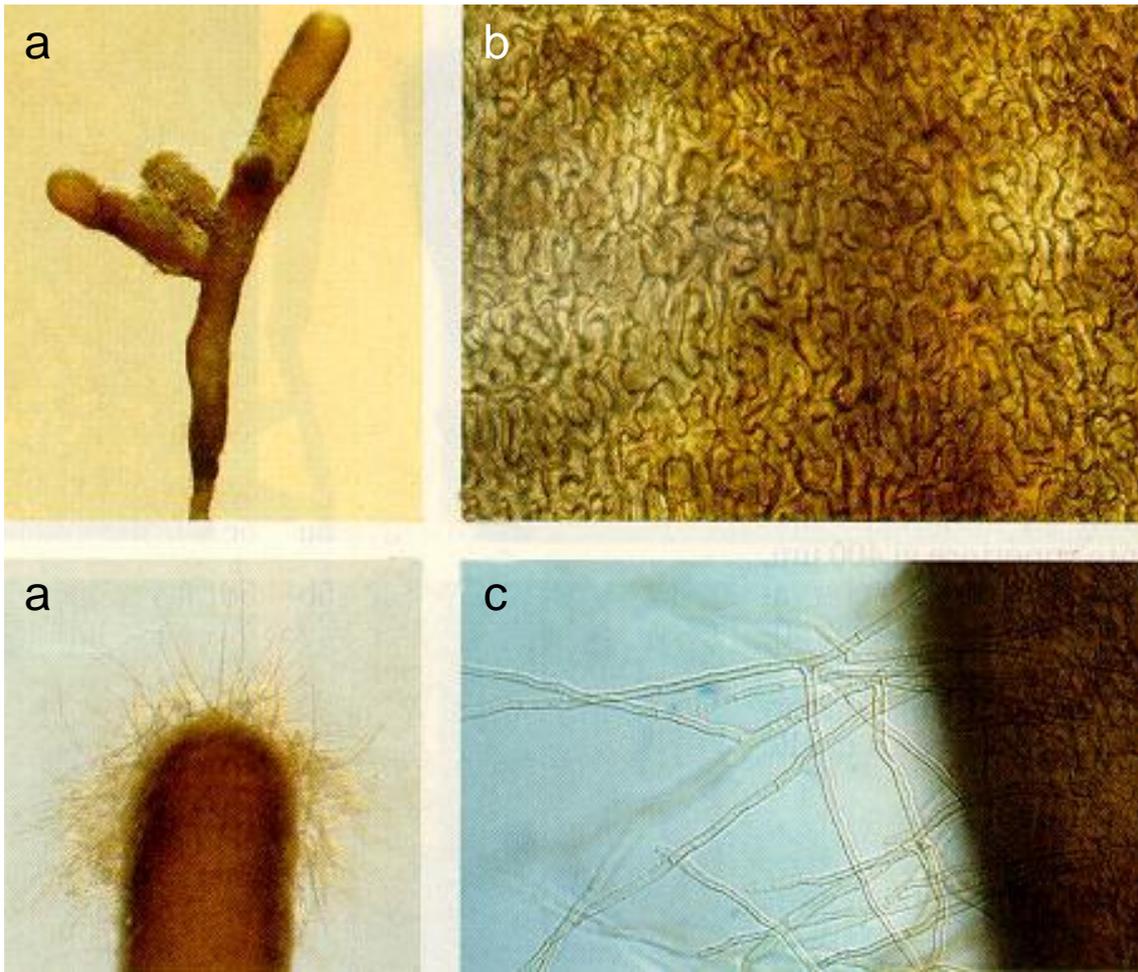
La asociación ectomicorrícica se produce en las raíces más finas de la planta, los ápices radiculares, y es difícil de apreciar a simple vista ya que las raicillas micorrizadas no suelen superar los 2 ó 3 mm de longitud y 0,3 a 0,5 mm de grosor (Smith y Read, 2008). El micelio fúngico no penetra en el interior de las células del córtex radical sino que se desarrolla intercelularmente y organiza una envoltura alrededor de las raíces micorrizadas, denominada manto (Fig.-5). Al penetrar las hifas del hongo entre las células del córtex, forman un entramado de hifas (red de Hartig) (Fig.-5) que aumenta la superficie de contacto entre los dos simbioses y facilita el intercambio de sustancias (González y De Miguel, 2005). Externamente las ectomicorrizas producen un engrosamiento de las raicillas terminales, debido al recubrimiento del manto fúngico, y a la vez provocan una intensa división radicular que confiere a la cabellera de raíces un aspecto coraloide muy particular u otro tipo de formaciones más o menos complicadas (dicotómicas, pinnadas, tuberosas, etc.) (Agerer y Rambold, 2004-2013). En algunos casos se forman glómérulos o apelonamientos de micorrizas cuando esta intensidad en la división radicular es muy

alta. El manto es de consistencia variable según las especies y presenta, superficialmente, diferentes tipos de dibujo en función de la estructura que formen sus hifas. Además, hace que se modifique el color pudiendo aparecer micorrizas de muy diversa coloración como negras, blancas, rosadas, azuladas, rojizas, marrones, nacaradas, etc.

Las micorrizas de la trufa negra (Fig.-6) son en general cilíndricas, rectas, indivisas o de ramificación pinnada, de color ámbar a pardo según su estado. El manto es pseudoparenquimático, con células redondeadas (Fig.- 10). Presenta cistidios algo amarillentos, rectos y ramificados en perpendicular, con tabiques aparentes en las ramificaciones (Zambonelli *et al.* 1993). Suelen presentarse en porciones determinadas, no en todo el contorno de la micorriza. (Reyna y de Miguel, 2007). Rauscher y Chevalier (1995), además diferenciaron entre ápices nuevos (ápices más hinchados con manto fúngico completo y colores amarillo-anaranjados-ocres-marrón) y ápices viejos (menos hinchados, con mantos no siempre totalmente presentes y colores oscuros de marrón oscuro a negruzco).



**Fig.-5** Esquema de una ectomicorriza: las hifas no penetran las células corticales de la raíz, ubicándose en el espacio intercelular.



**Fig.-6** Morfología y anatomía de lãs ectomicorrizas de *T. melanosporum*: a. Ápices micorrizados b. Manto pseudoparenquimático c. cistidios.

La morfología externa de las ectomicorrizas no sólo depende del hongo sino también de la planta simbiote, la cual gobierna caracteres como tamaño y tipo de ramificación, como puede observarse en las figuras 7, 8 y 9. El aspecto morfológico y el color de las micorrizas también varían según las épocas del año, teniendo cada hongo un periodo más o menos favorable para su observación según Giraud (1988). El mismo autor define el periodo de octubre a mayo como el más favorable para observar las micorrizas de *T. melanosporum*.

La evolución mensual del número de ápices viejos de *T. melanosporum* es mucho más estable. En verano, las plantas tienen menor número de micorrizas, pero no hay ningún mes concreto en que se haya observado una mayor presencia de ápices viejos de trufa negra

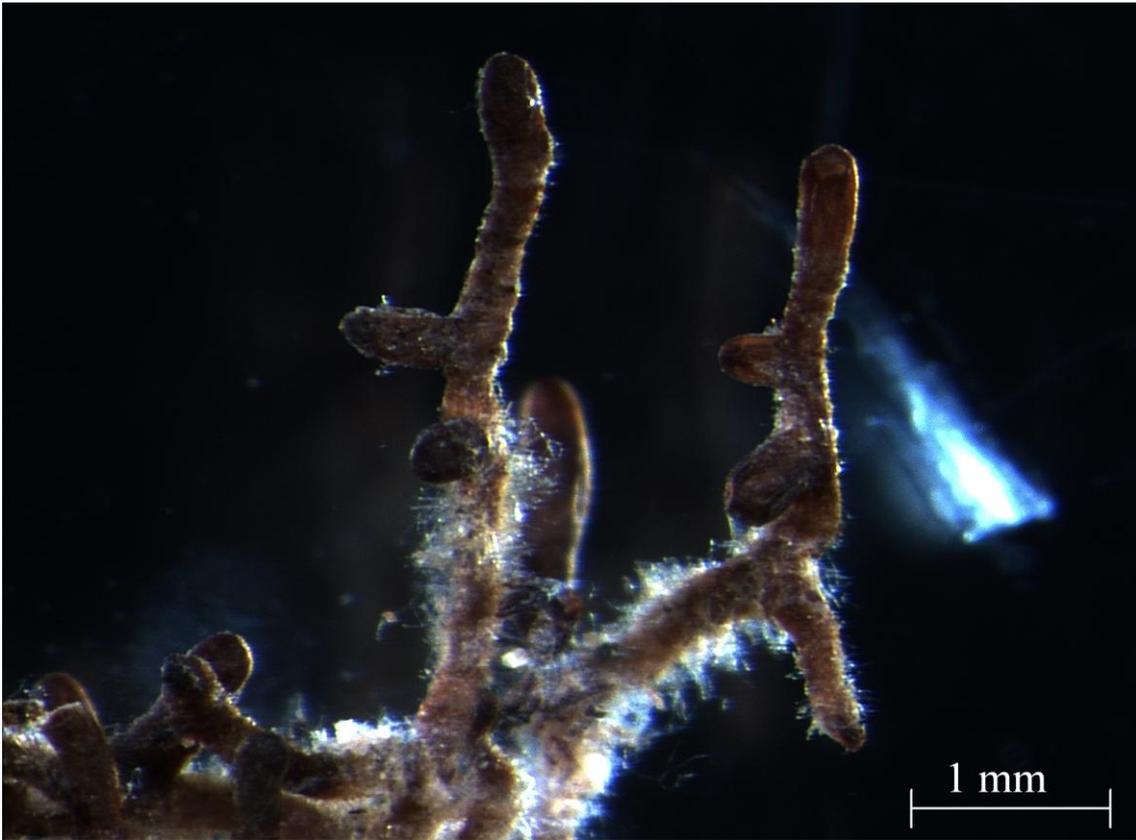


Fig.-7 Micorrizas de *T. melanosporum* sobre *Quercus ilex*



Fig.-8 Micorrizas de *T. melanosporum* sobre *Corylus avellana*. Fuente: [www.deemy.de](http://www.deemy.de)

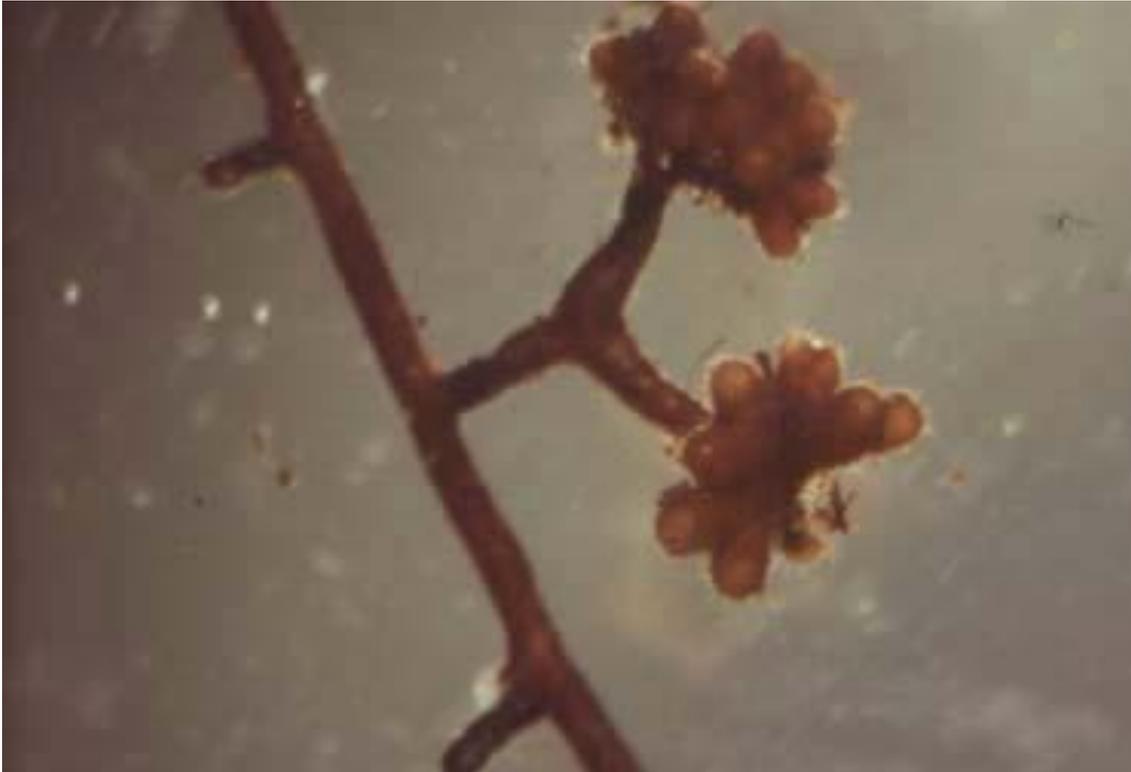


Fig.-9 Micorrizas de *T. melanosporum* sobre *Pinus halepensis*. Fuente: Dominguez 2002

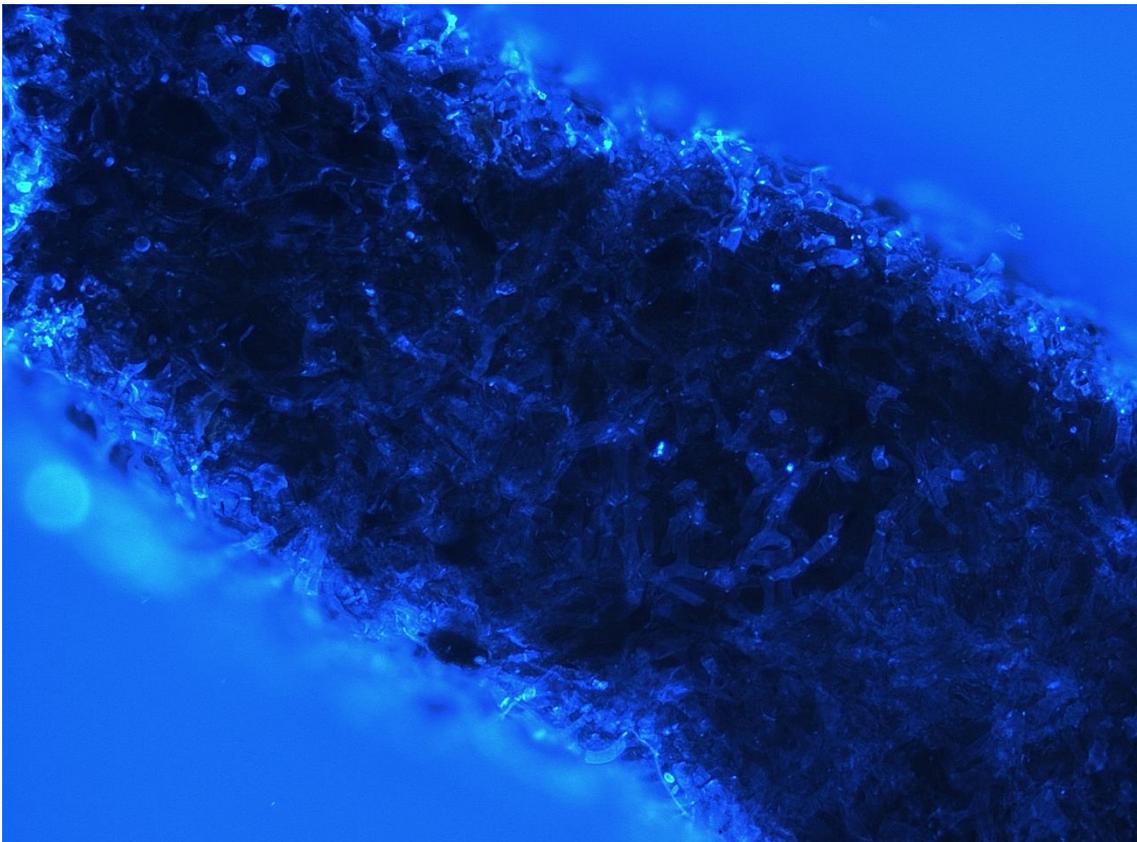


Fig.-10 Detalle del manto de una micorriza de *T. melanosporum* vista con microscopio de fluorescencia.

### 1.1.2 Ciclo biológico

En el transcurso del cultivo de cualquier organismo es importante conocer su ciclo biológico (Fig.-11). Además en este caso, todavía quedan ciertas incógnitas que poco a poco, gracias al avance de los estudios en el campo de la biología molecular y la genética, están siendo resueltas (Riccioni *et al.* 2008).

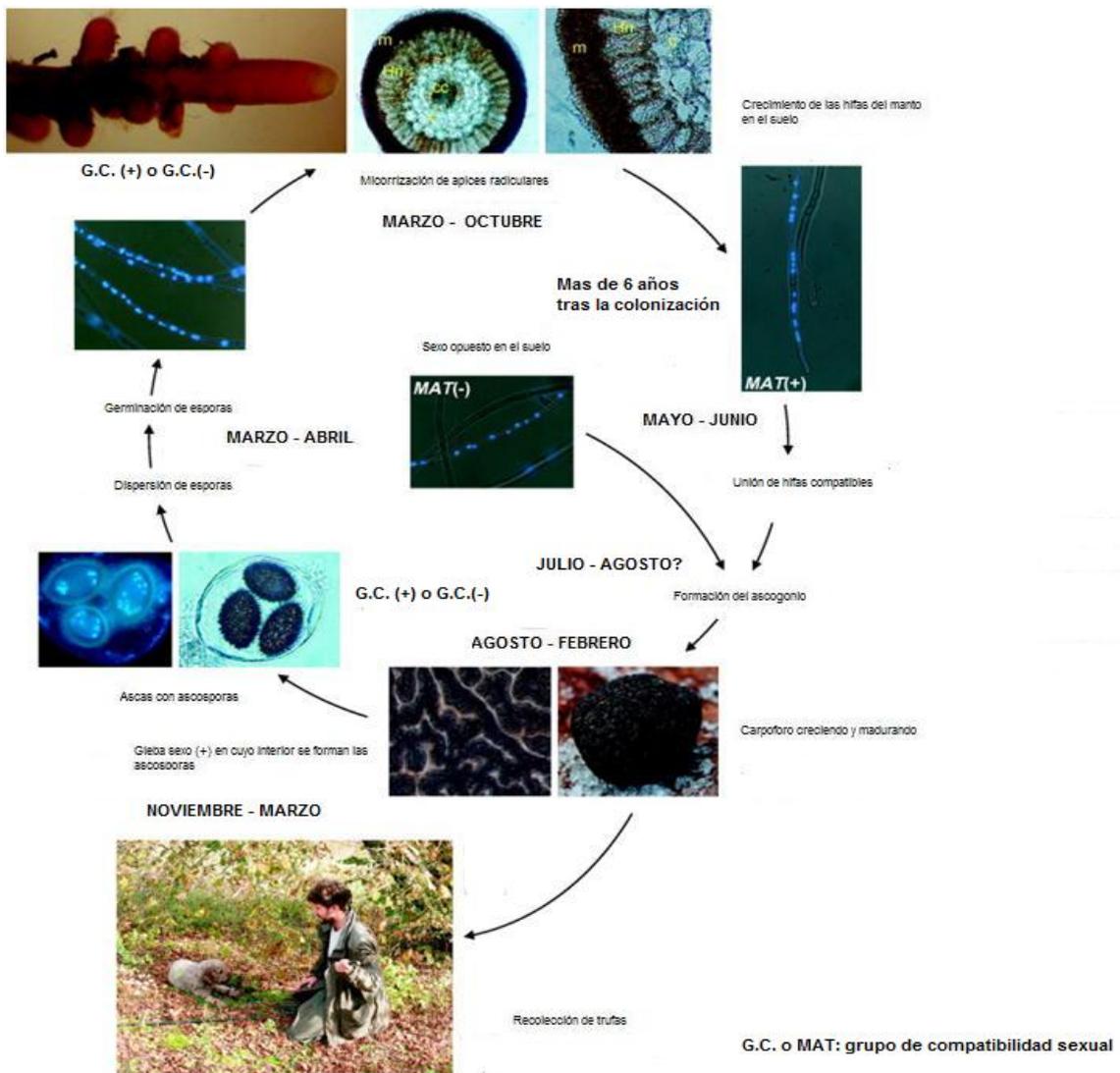


Fig.-11 Ciclo biológico de *T. melanosporum* (Modificado de Kües y Martin, 2011).

Para primavera, por causas todavía desconocidas, la espора germina emitiendo una hifa fina que pronto ramificará en busca de los ápices radiculares de algún árbol susceptible de ser infectado. En este proceso contribuye la flora microbiológica asociada al carpóforo (Rivera, 2009). El hongo se introduce entre las células formando la micorriza y empieza a emitir un nuevo micelio que ocupará todo el suelo que rodea al ápice infectado, pudiendo entrar en nuevos ápices. Este proceso se va repitiendo a

lo largo de los años de vida de la plantación siendo aparentemente necesarios unos 5 años para alcanzar la biomasa suficiente para entrar en producción (Palazón *et al.* 2007).

En torno al mes de mayo se produce la unión de hifas sexualmente compatibles, hecho que hasta hace poco aún estaba en duda, pues la escasa variabilidad genética encontrada en la especie hacía sospechar que era homotálica, es decir, tenía la capacidad de autofecundarse (Riccioni *et al.* 2008). Hoy en día se conocen los genes implicados en la compatibilidad sexual en esta especie, incluso puede saberse a qué tipo pertenecen micorrizas concretas (Rubini *et al.* 2011). A partir del engrosamiento de esta unión se formará la trufa. Antes se pensaba que los primordios se independizaban del ápice y comenzaba una fase saprofitica, pero de nuevo otro estudio demostró que la conexión entre la trufa y el árbol dura hasta su maduración (Zeller *et al.* 2008). Durante esta fase la trufa pasará de un peso de entre 0,001g o 0,05g (Fig.-12) a varias decenas de gramos. A medida que va creciendo irá emitiendo distintos tipos de aromas que atraerán a animales e insectos los cuales se alimentarán de ella produciendo el proceso de dispersión y cerrando el ciclo (Olivier *et al.* 2002).



Fig.- 12 Primordios de *T. melanosporum*. En esta imagen se puede apreciar su color rojizo. Fueron recogidos el mes de agosto.

Este periodo dura unos ocho meses, desde la aparición de los primordios hasta que madura la trufa, siendo bastante importante en esta fase la humedad del suelo, ya que en años malos para la trufa, las lluvias de finales de verano han sido beneficiosas para la posterior cosecha (Reyna, 2011). La maduración es muy escalonada y dura de noviembre a marzo.

### 1.1.3 El cultivo de la trufa

La trufa puede encontrarse en la naturaleza de dos maneras distintas: De forma silvestre o cultivada.

La trufa silvestre, recolectada en quejigares, encinares, etc. contribuye con un mayor porcentaje a la producción total, pero está disminuyendo debido al escaso mantenimiento de los bosques, a la recolección furtiva con útiles inadecuados y al cambio climático (Reyna, 2011). La trufa procedente de plantaciones de árboles micorrizados va en aumento y, aunque hace poco tiempo que comenzó a cultivarse en España (40 años), muchas de ellas ya han entrado en producción (De Miguel, 2005).

El cultivo de trufas mediante la plantación de especies forestales (encinas, robles, etc) previamente micorrizadas, se llama truficultura. Actualmente se realizan plantaciones en aquellas comarcas donde ya hay trufa natural en sus montes y también en otras zonas que presentan condiciones de suelos y clima favorables para el desarrollo del hongo.

La truficultura se apoya en tres pilares:

- Suelo y clima propicio
- Planta bien adaptada al medio y bien micorrizada por la trufa
- Prestar los apoyos necesarios al cultivo

De modo general, una plantación requiere de un estudio previo del terreno -suelos calcáreos de textura favorable- en climas mediterráneos-continetales, con 400-800 mm de precipitación anual, parte de ella en periodo estival, con una altitud entre 700-1300 msnm (Reyna, 2011). Además es importante que el cultivo precedente no sea forestal, ya que para evitar la competencia de otros hongos ectomicorrízicos en la plantación (Reyna *et al.* 2006). Realizar la plantación requiere una preparación previa de la parcela, cerciorarnos en adquirir una buena planta, no solo de aspecto sino de calidad de micorrización. Una vez realizada la plantación los dos o tres primeros años nos cuidaremos de sacar la planta adelante con escardas, algún riego en verano y el trabajo de las calles entre hileras con cultivador durante la primavera y el inicio del verano. Suelen emplearse protectores forestales para evitar daños por heladas o por animales. En previsión del tamaño final de los árboles y para facilitar las labores se recomienda emplear un marco de 6x6 m como mínimo.

El trabajo de las calles suele finalizar hacia el cuarto-sexto año cuando empiezan a aparecer los quemados (zona desprovista de vegetación herbácea por la acción alelopática del hongo) (Fig.- 13). La poda puede iniciarse hacia el tercer año. Si el riego en producción no va a ser posible puede ser interesante no podar salvo pequeñas intervenciones en árboles muy determinados. La producción suele iniciarse entre el sexto y el décimo año. El riego y su correcto manejo son fundamentales para

una producción regular y conseguir una buena rentabilidad de la plantación, principalmente en años de sequía estival. La apertura de pozos en el quemado enterrando una mezcla de materia orgánica con esporas o no, con o sin diferentes componentes que la puedan mejorar, parece fundamental a día de hoy para aumentar de forma importante la producción de trufas así como su calidad. El papel de las micorrizas en un ecosistema forestal es vital y debe contemplarse tanto desde la perspectiva del árbol como de la del hongo; en las truferas apenas se puede intervenir de forma directa sobre el micelio o las micorrizas, sin embargo, de forma indirecta sí se puede hacer a través del árbol (Sánchez, 2012). El periodo productivo de la plantación se desconoce, pero mantener la producción durante 25 años parece muy razonable (35 desde que se inicia la plantación), incluso más años con intervenciones de aclareos, podas, etc.

La truficultura en España tiene un corto recorrido todavía, con toda seguridad se irán conociendo nuevos apoyos y técnicas para mejorar los rendimientos. Hoy día puede hablarse de producciones medias de 20-30 kg/ha en plantaciones adultas y un precio medio de 550 €/kg (Oliach *et al.* 2010).



**Fig.-13** Plantación de *Quercus ilex* micorrizada con *T. melanosporum* de 9 años de edad, en Sarrión (Teruel). Pueden observarse los quemados alrededor de las encinas.

## 1.2 La planta micorrizada y la evaluación de su calidad

Con el conocimiento de la existencia de hongos ectomicorrícicos en las plantas de muchos ecosistemas naturales, llegó el reconocimiento de que la simbiosis podría manipularse para reforzar la productividad en programas de reforestación y cultivo de especies fúngicas.

Se han desarrollado técnicas especiales que permiten a los hongos seleccionados colonizar plantas, previamente a la plantación en campo. La aplicación de estas técnicas ha facilitado la mejora de los resultados en cultivos forestales en muchas partes del mundo, particularmente en lugares con ausencia de fuentes naturales de inóculo de micorrización (Wilde, 1944; Shemakhanova, 1962; Stoeckeler y Slabauch, 1965; Mikola, 1969, 1973; Hacskeylo y Vosso, 1971). Durante estos años creció el interés en la posibilidad de recolectar cuerpos de fructificación de hongos ectomicorrícicos comestibles que se han usado como inóculo comercial para complementar tanto la dieta como los ingresos. Moser (1958) en Austria, Takacs (1967) en Argentina y Theodorou y Bowen (1973) en Australia, fueron pioneros en el uso de inóculo de hongos que eran fisiológica y ecológicamente apropiados para el lugar de plantación, con vistas a mejorar la actuación en los cultivos.

La producción controlada de planta micorrizada con *T. melanosporum*, es una de las bases sobre las que se sustenta la truficultura de hoy en día. Desde que a finales de los años 60, la labor conjunta entre la Universidad y el IPLA de Turín con el INRA de Clermont-Ferrand, (Chevalier y Grente, 1973), permitió el establecimiento de un método seguro para la producción de plantas micorrizadas con dicho ascomiceto, han sido muchos los años transcurridos sin que los detalles de dicha metodología hayan visto la luz, por motivos evidentes de estrategia empresarial. Sin embargo, durante ese periodo, se han producido diversas modificaciones referentes a los contenedores, al tipo de sustrato y al método de inoculación empleado, intentando una mayor seguridad y eficacia en la micorrización. Según Cocina *et al.* (2013), actualmente en España, se conocen un mínimo de 27 empresas viveristas especializadas en planta micorrizada, localizadas en su mayor parte en la provincia de Teruel (Tabla 1).

El abastecimiento de plantones micorrizados con trufa negra, para las necesidades actuales de las nuevas plantaciones, está más que asegurado; sin embargo, las previsiones indican una progresiva reconversión de los cultivos de secano de zonas potencialmente truferas, hacia la forestación con frondosas micorrizadas. Las principales razones de esta reconversión son dos; por una parte, las ayudas

tradicionales de la Política Agraria Comunitaria (PAC) tienen un horizonte limitado y, en segundo lugar, las Comunidades Autónomas y las Administraciones Locales están apostando cada día con más fuerza por esta actividad, abriendo líneas de ayudas económicas bastante importantes, para proporcionar alternativas y colaborar en la diversificación agraria y en la forestación.

En España, la aparición en el mercado de plantas micorrizadas no se produjo hasta finales de los años 80, utilizando envases en bolsa de plástico, con tierra esterilizada, e inoculando mediante una suspensión esporal, bien sobre semilla o sobre plántula. Los métodos de producción han ido mejorándose y adaptándose a los requerimientos de calidad, tanto de la planta como de la micorrización propiamente dicha; sin embargo, las técnicas utilizadas siguen manteniéndose en secreto, constituyendo uno de los principales valores de las empresas dedicadas a estos fines, que guardan celosamente su experiencia adquirida, protegida en ocasiones por patentes industriales, siendo normal, por ello, que el resultado final esté marcado con un precio en torno a los 6-8 euros/planta.

Algo muy importante que ofrecen la mayoría de los viveros productores, de una cierta entidad, es el asesoramiento en el desarrollo de su proyecto trufero que integra el tipo de plantación adecuada, el seguimiento de la misma, los cuidados culturales y en ocasiones, hasta la recolección y comercialización de su producción.

En este momento es posible obtener en vivero distintas especies arbóreas micorrizadas por la especie de hongo micorrícico deseado, para cubrir las necesidades de cada área, aunque el 95% de la producción es de encinas micorrizadas con *T. melanosporum*.

A la hora de establecer una plantación, lo más habitual es recurrir a viveristas especializados que faciliten las plantas micorrizadas. El viverista asume plenamente la responsabilidad de que la especie está convenientemente micorrizada en las raíces de las plantas jóvenes para que en un futuro pueda ser productora de trufas.

Cuando se realiza la plantación de un plantón micorrizado con *T. melanosporum* en el terreno comienza una dura batalla contra los hongos nativos del suelo en el que se instala, en su mayoría, más adaptados a las condiciones de la zona (Sourzat, 2004). Es muy importante que el material de partida para realizar la plantación sea de la mejor calidad, sobre todo en cuanto a porcentaje de ápices micorrizados por la trufa negra puesto que se evita en gran medida que puedan ser ocupados por otros hongos micorrícicos existentes pudiendo disminuir las futuras producciones de trufa.

Tabla 1 Viveros productores de planta micorrizada con *Tuber* sp en España (Modificado de Cocina *et al.* 2013). Se indica, además del contacto, si producen plantas micorrizadas con especies de géneros diferentes a *Tuber*.

Nombre del vivero	Contacto	Otras Especies
El Origen de la Trufa (Andalucía)	<a href="http://www.elorigendelatrufa.com">www.elorigendelatrufa.com</a>	No
Aragotruf S.L. (Aragón)	<a href="http://www.plantastruferas.com">www.plantastruferas.com</a>	No
Cultivos Forestales y Micológicos (Aragón)	<a href="http://www.cultivosforestales.com">www.cultivosforestales.com</a>	Si
Hermanos Salvador Redón (Aragón)	<a href="mailto:trufassarreon@hotmail.com">trufassarreon@hotmail.com</a>	No
Inotruf, S.L. (Aragón)	<a href="http://www.inotruf.com">www.inotruf.com</a>	No
Miguel Santafé Bertolín e Hijos (Aragón)	Teléfono: + 34 978 78 04 29	No
Trufico (Aragón)	<a href="mailto:trufico@yahoo.es">trufico@yahoo.es</a>	No
Turoltrufa (Aragón)	<a href="http://turoltrufa.com">http://turoltrufa.com</a>	No
Viveros Daniel Bertolín (Aragón)	<a href="http://www.trufasdanielbertolin.com">www.trufasdanielbertolin.com</a>	No
Viveros Hermanos Tolsá S.C. (Aragón)	Teléfono: +34 659 887 561	No
Vivero José Igual (Aragón)	<a href="mailto:j.igual@hotmail.com">j.igual@hotmail.com</a>	No
Viveros José Rozalén (Aragón)	<a href="http://www.trufasrozalen.es">www.trufasrozalen.es</a>	No
Viveros y Trufas La Incosa (Aragón)	Teléfono: +34 978 72 80 12	No
VITRUF (Castilla-La Mancha)	<a href="http://www.vitruf.com">www.vitruf.com</a>	No
MICONATUR S.L (Castilla-La Mancha)	<a href="http://www.campodetrufas.com">www.campodetrufas.com</a>	Si
Aire Puro de Urbión, S.L.L. (Castilla y León)	<a href="http://www.airepurodeurbion.com">www.airepurodeurbion.com</a>	No
Viveros Encitruf (Castilla y León)	<a href="http://www.encitruf.es">www.encitruf.es</a>	No
Viveros Forestales Santa Ana (Castilla y León)	<a href="http://www.viverosforestalesantaana.com">www.viverosforestalesantaana.com</a>	No
Viveros Fuenteamarga (Castilla y León)	<a href="http://viverosfuenteamarga.com/">http://viverosfuenteamarga.com/</a>	Si
Viveros Tuber (Castilla y León)	<a href="mailto:viverostuber@yahoo.es">viverostuber@yahoo.es</a>	No
Micología Forestal & Aplicada (Catalunya)	<a href="http://www.micofora.com">www.micofora.com</a>	Si
Viveros Alto Palancia (Com. Valenciana)	<a href="http://www.planta-trufa-viveros-alto-palancia.es">www.planta-trufa-viveros-alto-palancia.es</a>	No
Viver-truficultura (Com. Valenciana)	<a href="http://www.viver-truficultura.com">www.viver-truficultura.com</a>	No
Hifas da Terra (Galicia)	<a href="http://www.hifasdaterra.com">www.hifasdaterra.com</a>	Si
Thader Biotechnology S.L. (Murcia)	<a href="http://www.thaderbiotechnology.es">www.thaderbiotechnology.es</a>	Si
Viveros Alharabe (Murcia)	<a href="http://www.viverosalharabe.com">www.viverosalharabe.com</a>	Si
Viveros VEPLAM (La Rioja)	<a href="http://www.sotoencameros.org">www.sotoencameros.org</a>	No

La planta de vivero debe cumplir los parámetros de calidad forestal y presentar un grado óptimo de micorrización por la especie inoculada, así como estar desprovista de otros tipos de micorrizas, aunque en ocasiones se producen contaminaciones por hongos típicos de viveros. A continuación se detallan todos estos parámetros.

### 1.2.1 Calidad forestal de la planta y su caracterización

Las características que deben reunir las plantas de vivero, y que relacionamos con su calidad forestal, deben tener presente la diversidad y heterogeneidad de cada una, puesto que no son plantas clonadas, en este caso.

Por otra parte, pese a que las características morfológicas y fisiológicas que definen la planta de calidad pueden variar según los intereses de las distintas partes involucradas en la producción, manejo y empleo final de la planta (Ritchie, 1984; Folk y Grossnickle, 1993), parece lógico pensar que tales características deberían maximizar la supervivencia, crecimiento y potencial reproductivo de la planta trasplantada. Así, el concepto de calidad de planta, entendido como adecuación al uso, puede definirse como la capacidad de una planta forestal para alcanzar las expectativas de supervivencia y crecimiento de una estación particular. Esta capacidad es el reflejo de unas condiciones morfológicas y fisiológicas de la planta que le permiten una mejor respuesta frente a los factores propios del lugar de establecimiento, y que van a manifestarse a través de su capacidad para superar el estrés de plantación y crecer correctamente.

Se han empleado multitud de atributos morfológicos cuantitativos para caracterizar la calidad de una planta (Mexal y Landis, 1990). Los más utilizados han sido la altura de la parte aérea (altura del extremo de la yema terminal sobre el cuello de la raíz) el diámetro del cuello de la raíz y los pesos secos de la raíz y la parte aérea (también conocidos como biomasa) (Chavasse, 1980), todos ellos descriptores del grado de desarrollo de la parte aérea y radical. También se han usado índices o relaciones morfológicas, que son combinaciones de dos o más atributos morfológicos, siendo la esbeltez (cociente entre la altura y el diámetro en el cuello de la raíz) y la relación entre el peso seco de la parte aérea y la radical (PA/PR) los más empleados para interpretar el equilibrio entre las distintas fracciones.

La morfología de la planta es la manifestación de la respuesta fisiológica de la misma a las condiciones ambientales y a las prácticas culturales del vivero, y generalmente es fácil de cuantificar.

El número de posibles parámetros morfológicos a examinar es alto y como algunos de ellos están muy correlacionados, se deben elegir aquellos que proporcionen una mayor información y sean de medición más sencilla.

Altura. Es fácil de medir pero no es muy informativa por sí sola. Ofrece sólo una somera aproximación del área fotosintetizante y transpirante, e ignora la arquitectura del tallo. La altura puede ser manipulada en vivero a través de la fertilización, el riego y el repicado. Varios estudios han concluido que la altura inicial de las plantas no se correlaciona, o lo hace de forma negativa, con la supervivencia, aunque sí se correlaciona con el crecimiento en altura tras la plantación (Thompson, 1985). Por otro lado, algunos estudios han mostrado que la ventaja inicial en el tamaño de la planta permanece en el tiempo.

Diámetro del cuello. Es también de fácil medición. El cuello es el punto de separación entre el tallo y la raíz, definido por la localización de la semilla (bellota en *Q. ilex*). Da una aproximación de la sección transversal de transporte de agua, de la resistencia mecánica y de la capacidad relativa para tolerar altas temperaturas en la superficie del suelo. El diámetro está influenciado por la densidad del cultivo en vivero y puede verse afectado por prácticas culturales como el repicado apical. El diámetro de la planta se puede también mejorar a través de un aumento en la velocidad y la uniformidad en la germinación (Boyer y South, 1987).

Cociente de esbeltez: es la relación entre la altura de la planta (en cm) y el diámetro del (en mm), siendo un indicador de la densidad de cultivo. Es un parámetro importante en las plantas en contenedor, donde se pueden desarrollar plantas ahiladas (Thompson, 1985). En *Q. ilex* este cociente se encuentra entre 0,7 y 1,0 cm/mm.

En concreto, la normativa vigente de calidad de planta de la Unión Europea, y en sus correspondientes transposiciones (RD 1120/2011, de 5 de septiembre, por el que se modifica el Real Decreto 289/2003, de 7 de marzo, sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción), define la altura y el diámetro del tallo que deben cumplir los lotes de plantas en varias especies forestales para ser considerados de calidad cabal, entre otras consideraciones relacionadas con la morfología del sistema radicular y aéreo de la planta, analizadas visualmente, y que se detallan a continuación.

### **Requisitos aplicables a las plantas comercializadas para el consumidor final en regiones de clima mediterráneo:**

Las plantas no se comercializarán a menos que el 95 % de cada lote sea de calidad cabal y comercial.

**A. No se considerará de calidad cabal y comercial las plantas que presenten algunos de los defectos numerados en la tabla 2.**

Tabla 2 Caracteres morfológicos no deseables en plántones de *Quercus ilex* para ser micorrizados

<p>Heridas distintas de las causadas por la poda o heridas debidas a los daños de arranque.</p>	
<p>Ausencia de yemas susceptibles de producir un brote apical.</p>	
<p>Tallos múltiples. Ausencia de raíces primarias.</p>	
<p>Sistema radicular deformado. <i>No cumple normativa: ángulo &lt;math&gt;&lt; 110^\circ&lt;/math&gt;</i></p>	

<p>Signos de desecación, recalentamiento, enmohecimiento, podredumbre o daños causados por organismos nocivos.</p>	
<p>Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical.  Escasez de raíces tróficas.</p>	

En el caso de la producción de planta micorrizada, los requisitos deseables son lo que aparecen en la figura 14.

<p><b>Planta adecuada para ser micorrizada</b></p> <p>Planta de 5 meses de edad. Buena salud, carente de problemas fitopatológicos visibles o heridas. Bien definida la yema apical. Equilibrio entre parte aérea y radicular. Altura tallo y diámetro de cuello adecuados Sistema radicular con abundantes raíces tróficas y no deformado. Presencia de la bellota.</p>	
--	--

Fig.- 14 Características de una planta con calidad forestal previo a la inoculación.

## B. Dimensiones de las plantas para *Q. ilex* (Tabla 3):

Tabla 3 Medidas de alturas y diámetros de cuello en plántulas de *Q. ilex* para ser micorrizadas según RD.

Edad máxima (años)	Altura mínima (cm)	Altura máxima (cm)	Diámetro mínimo del cuello de la raíz (mm)
1	8	30	2
2	15	50	3

**C. Tamaño del contenedor:** volumen mínimo de 200cm<sup>3</sup>.

### 1.2.2 Posibles contaminantes en vivero.

La planta inoculada debe estar desprovista de cualquier micorriza del género *Tuber* diferente a la que ha sido inoculada. Y no debe sobrepasar ciertos niveles de contaminación por otras micorrizas competidoras.

#### **Contaminantes diferentes a *Tuber***

Las plantas de vivero se pueden ver colonizadas por especies contaminantes típicas de vivero como *Sphaerospora brunnea*, (Fig.-15) *Telephora terrestris* (Fig.-16) *Laccaria* sp., *Trichophaea woolhopeia* (Fig.-17) u otros hongos, tal como se mencionan en trabajos Zambonelli y Brazanti (1987), Meotto y Carraturo (1987-88), Honrubia *et al.* (1992), Meotto *et al.* (1992), Bencivenga *et al.* (1995) y Di Massimo *et al.* (1996) entre otros.

La causa de su aparición suele ser una incorrecta desinfección del sustrato, sin embargo, algunas especies logran colonizar *a posteriori* los contenedores de los invernaderos.



Fig.- 15 Micorrizas de *Sphaerospora brunnea* con el manto característico y carpóforo. Foto: Sánchez 2012.



Fig.- 16 Micorrizas de *Thelephora terrestris* (Ehrh.) Fr. [www.deemy.de](http://www.deemy.de)

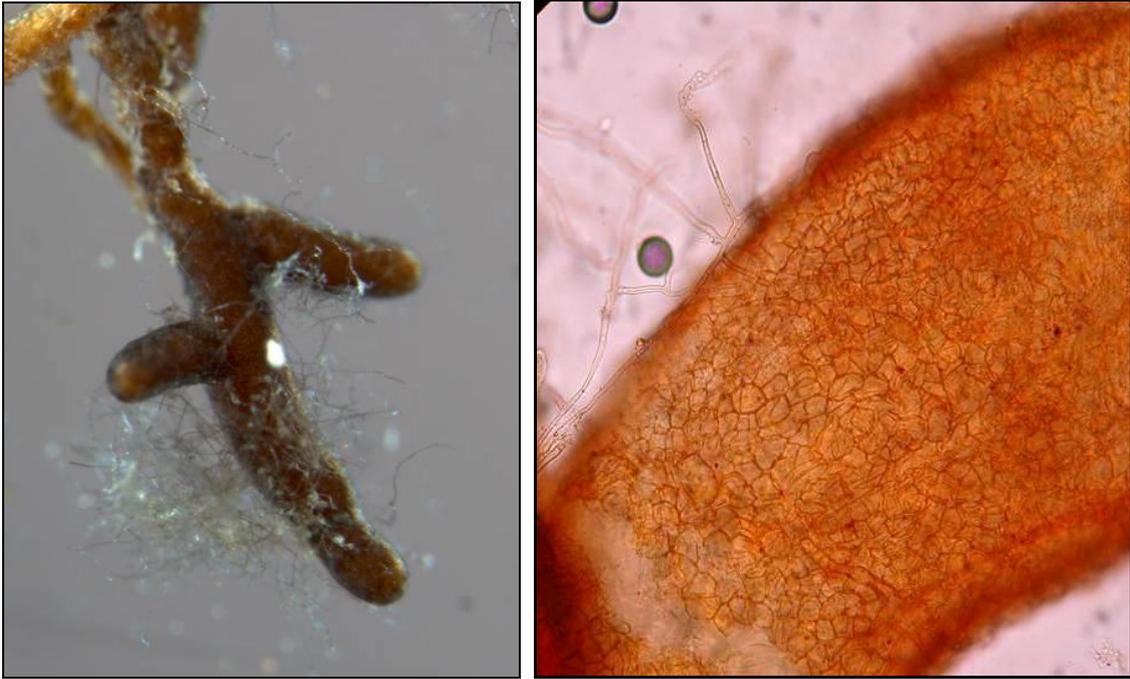


Fig.- 17 Micorriza de *Trichophaea woolhopeia* y detalle del manto característico. Foto: Sánchez 2012.

### **Contaminantes del género *Tuber***

La detección de micorrizas de otras especies del género *Tuber* no es muy frecuente pero cuando sucede implica descartar el lote entero ya que su venta puede considerarse como un fraude. En el caso de aparición de otros *Tuber* en la planta inoculada es más probable que se deba a un error del viverista en la identificación de los carpóforos empleados como inóculo, que a una insuficiente desinfección del sustrato. Teniendo en cuenta que un gramo de trufa madura puede albergar entre 5 y 20 millones de esporas (Bernal, 2008), cualquier error, aunque el carpóforo sea pequeño, puede repartir la contaminación por todo un vivero. Principalmente la confusión puede darse con *T. brumale*, y menos frecuentemente con *T. aestivum*.

*T. brumale* es una especie similar a *T. melanosporum* y las épocas de fructificación de ambas se solapan. Aunque sus esporas poseen caracteres diferentes sólo los observadores experimentados son capaces de distinguirlas, lo cual es determinante a la hora de preparar un inóculo adecuado para producir la planta micorrizada. Los carpóforos son el mejor modo de diferenciarlas, pero deben encontrarse en buen estado de conservación y madurez (Fig.- 18): el peridio de *T. brumale* no es adherente y las venas de su gleba son más anchas y de un aspecto más grisáceo que las de *T. melanosporum* (Montecchi y Sarasini, 2000; Rioussset *et al.* 2001). Sus micorrizas son

difícilmente diferenciables si son jóvenes y aún no han formado cistidios, ya que ambas poseen mantos con células epidermoides. El hecho de que en alguna ocasión hayan sido detectadas en planta de vivero (A. De Miguel, com. pers.) y su presencia en cierta cantidad de plantaciones como ha podido comprobarse en algunos trabajos (De Miguel y Sáez, 2005; Sánchez, 2008; Águeda *et al.* 2010; Sánchez, 2012), justifica la necesidad de controlar adecuadamente la planta para asegurar su ausencia.



Fig.- 18 Carpóforos de *Tuber melanosporum* (izquierda y derecha) y *T. brumale* (centro), el primero podría confundirse con un carpóforo inmaduro de *T. brumale*.

El caso de *T. aestivum* es menos problemático en vivero porque la posibilidad de confusión entre carpóforos es muy baja, incluso al no solaparse las épocas de fructificación es menos probable su aparición en un lote de trufa que se pretenda emplear para micorrizar planta. En cuanto a las micorrizas, *T. aestivum* es la que mejor se diferencia del resto, principalmente por su manto con células angulares y sus cistidios indivisos, largos y sinuosos (Agerer y Rambold, 2004-2013).

Se debe comentar algunos aspectos relacionados con otra especie del género, *T. indicum*, que aún no ha sido detectada en España pero cada vez es más importante estar alerta por su posible entrada.

*T. indicum* es una especie asiática extremadamente similar a *T. melanosporum* en multitud de aspectos:

- Morfológicamente: sus micorrizas son idénticas y sus carpóforos muy parecidos, solamente se encuentran diferencias claras en la ornamentación de sus esporas (Riousset *et al.* 2001). Por este motivo, a nivel de control de planta de vivero, no puede asegurarse por morfología si se trata de una o de otra especie.
- Genéticamente: ambas especies están muy cercanas. Incluso algunos autores se preguntan si podrían llegar a darse hibridaciones entre ellas (Murat *et al.* 2008).
- Biogeográficamente: *T. indicum* posee un amplísimo rango de hábitats en los que puede fructificar y algunos de ellos coinciden con los de *T. melanosporum* (Yang, 1999; Wang *et al.* 2007), comportándose por tanto como especies vicariantes.

La calidad organoléptica es quizás la mayor diferencia entre las dos especies (D. Blanco, com. pers.) lo cual hace que el precio de venta de *T. indicum* esté del orden de 10 veces por debajo del de la trufa negra. Sin embargo, su demanda es enorme lo cual ha dado pie al establecimiento de plantaciones de árboles micorrizados con esta especie en China (Geng *et al.* 2009).

La importación en fresco de carpóforos de *T. indicum* ha provocado ya su entrada en, al menos, una plantación en Italia destinada a producir *T. melanosporum*, en la cual se han localizado ectomicorrizas de esta especie (Murat *et al.* 2008) y en otra plantación de EEUU donde, además, ha llegado a fructificar (Bonito *et al.* 2011). No se ha localizado más información al respecto pero la posibilidad de que esté presente en alguna plantación española y francesa es tan alta que justifica la realización de prospecciones en viveros comerciales para evitar su entrada y en campo para comprobar su ausencia.

### **1.2.3 Situación actual de la evaluación de planta micorrizada por *T. melanosporum* en Europa**

La evaluación sobre la calidad de la planta se realiza por planta y por lote de plantas. Un lote es un conjunto de plantas que tienen una misma procedencia de la semilla, que se siembran a la vez, se inoculan con el mismo material y reciben las mismas prácticas de cultivo (Palazón *et al.* 1997) (aproximadamente cada lote contiene 1000 plantas).

Los métodos usados actualmente para evaluar el estado de micorrización de plantas son los siguientes:

**Chevalier *et al.* (1972)** INRA-ANVAR (Francia)

**Bencivenga *et al.* (1987)** UNIVERSIDAD DE PERUGIA (Italia)

**Fischer y Colinas (1996)** UNIVERSIDAD DE LERIDA (España)

**Reyna *et al.* (1997)** CEAM-VALENCIA (España)

**Palazón *et al.* (1999)** INIA-ARAGON (España)

A continuación, se resume cómo se realiza la certificación de plantas micorrizadas en los países productores principales: España, Francia e Italia.

## España

La producción de planta micorrizada con trufa negra en nuestro país carece, en el momento actual, de una normativa legal que regule su producción y certifique su calidad a nivel de toda España. En diferentes reuniones coordinadas por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) se propusieron varias metodologías para la evaluación y control de la planta de *Quercus*, especialmente *Q. ilex*, micorrizada con *T. melanosporum* (Fischer y Colinas, 1996; Palazón *et al.* 1997, 1999; Reyna, 1997; Reyna *et al.* 2000).

Dichas propuestas presentaban aspectos comunes, como la necesidad de establecer un control de los factores de producción, tales como las semillas, los sustratos, el agua de riego, los contenedores, el inóculo (Palazón *et al.* 1999; Reyna *et al.* 2000) y diferían fundamentalmente en el tipo de muestreo y en los umbrales mínimos admisibles de micorrizas y de los posibles contaminantes. Esta situación no es exclusiva de España, pues situaciones parecidas se dan en países como Italia y Francia, sin que se pueda establecer un criterio preferente que destaque sobre los demás. No obstante, en la Reunión del Grupo Europeo Tuber (GET) celebrada en Graus (España) en 2002, se instó a los diferentes países integrantes a elaborar un protocolo europeo de certificación único, protocolo GET, que pueda servir de referencia y que permita contrastarlo con los utilizados en la actualidad por los controladores actuales.

En cualquier caso, la situación actual en España viene condicionada por la existencia de Gobiernos Autonómicos, en los que cada uno en particular posee competencias para establecer las normas de calidad y de certificación de las plantas producidas dentro de su territorio, e incluso para delegar dicha misión a Instituciones o Entidades locales (Universidad, Patronatos, etc.).

Es esperable y deseable que, con el paso del tiempo, puedan unificarse las normas y establecer algún tipo de control obligatorio por parte del Estado, que garantice la ausencia de micorrizas invasoras, dentro de nuestro entorno ecológico, con atención especial hacia las especies de *Tuber* asiáticas, principalmente *T. indicum*.

Ante la situación actual sobre la evaluación de la calidad de planta micorrizada, se ha considerado que este trabajo debería aportar información importante para futuras decisiones en base a la unificación de criterios.

A este respecto, el día 5 de junio de 2012 se constituyó en Madrid el grupo de Trabajo, del que el autor forma parte integrante, denominado de Micología-Micorrizas por un

mandato legal como acuerdo del Comité de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos Forestales (en adelante CMCRGF) que es el órgano de Coordinación entre Estado y CCAA en la materia. Estableciéndose en el mismo que el camino a seguir del Grupo de Trabajo será el siguiente: Elevación de un informe al Comité Nacional de Directores para posteriormente pasar a la Conferencia Sectorial como pasos previos a su tramitación como norma con el rango de RD.

Volviendo a la situación actual en España, las comunidades autónomas en las que se evalúa planta micorrizada son: Aragón (Huesca y Teruel), Cataluña, Castilla y León, Comunidad Valenciana, Castilla La Mancha, Navarra, Andalucía, Galicia y Murcia.

### Huesca

El Centro de Investigación y Experimentación en Truficultura de Graus (Diputación de Huesca) emite un informe escrito de valoración de lotes de planta del vivero en particular a analizar (Fig.-19). Los análisis se realizan únicamente a los lotes previamente seleccionados por el comprador y como requisito imprescindible para que sea concedida la subvención de establecimiento de nuevas plantaciones truferas de la Diputación de Huesca. El método de análisis corresponde al de Palazón *et al.* (1999) INIA-ARAGON.

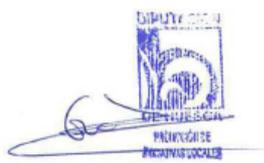
#### 4. CONCLUSIONES

Las muestras analizadas presentan un porcentaje medio de micorrización por *Tuber melanosporum* del **30,73%**, 0% de micorrización por otras especies de *Tuber* y 5,43 % del contaminante AD (*Trichophaea woolhopeia*) y 5,04% de *Sphaerosporella brunnea*.

Por ello, **el lote se considera de calidad suficiente y apto para el trasplante a campo.** (Tabla 3).

Tabla 3.- Conclusión de aptitud de las plantas analizadas.

VALORACIÓN FINAL DEL LOTE	APTO	RECHAZADO
	Porcentaje medio de micorrización: 30,73%	



En Graus a 30 de abril de 2013  
 Eva Gómez Molina  
 Técnico Medio en Truficultura  
 C.I.E.T.- Diputación Provincial de Huesca

Fig.-19 Certificado emitido por el CIET (Huesca) declarando la idoneidad del lote para truficultura.

## Teruel

La micorrización está controlada por los Servicios Agropecuarios de la Diputación Provincial de Teruel. Los viveros de Teruel están suscritos al convenio para la producción de planta trufera existente entre la Diputación Provincial de Teruel y los viveristas provinciales. Según este convenio dicha Diputación controla, anualmente, la producción de planta de los viveros, certificando la calidad de la misma en las etiquetas numeradas con las que los plantones salen a la venta (Fig.-20). Dichas etiquetas dan fe de que se trata de plantones micorrizados por trufa negra (*T. melanosporum*). El método de análisis corresponde al de Palazón *et al.* (1999) INIA-ARAGON.



Fig.-20 Etiqueta que garantiza el control de planta micorrizada por la Diputación Provincial de Teruel

## Cataluña

La Universidad de Lérida y el Centro Tecnológico y Forestal de Cataluña evalúa el grado de micorrización de diferentes lotes de toda España, informando sobre los resultados a los compradores de planta micorrizada para que ellos usen o no esos datos en la compra. El método empleado de análisis es el de Fischer y Colinas (1996).

## Castilla León

El departamento de Investigación Forestal de Valonsadero (Soria), emitía un informe escrito de valoración de lotes de planta del vivero en particular a analizar. Empleaban el método de Fischer y Colinas (1996) de la Universidad de Lérida.

## Comunidad Valenciana

Se emite un informe escrito de valoración por CEAM (Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo) y la Universidad Politécnica de Valencia de lotes de planta del vivero en particular a analizar. Analizan y evalúan la planta por el método de Reyna *et al.* (1997) de la Universidad de Valencia.

### Castilla La Mancha

El Departamento de Biología de la Universidad de Alcalá de Henares y el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales El Serranillo (Guadalajara) utilizan el método de Fischer y Colinas (1996) para evaluar planta micorrizada.

### Navarra

La Facultad de Biología de la Universidad de Navarra, emplea un método propio de evaluación modificado de Brundett (2008).

### Andalucía

No existe ninguna entidad que evalúe la planta. Evaluación por el método de Palazón *et al.* (1999) por los propios viveristas.

### Galicia

No existe ninguna entidad que evalúe la planta. Evaluación de la planta por el método de Fischer y Colinas (1996) en el Departamento de Investigación Forestal de Valonsadero (Soria).

### Murcia

El Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales El Serranillo (Guadalajara) evalúa sus plantas de viveros de Murcia por el método de Fischer y Colinas (1996).

### **Francia**

Los viveristas franceses disponen de un servicio de certificación del INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) que proporciona a sus clientes la garantía de que las plantas están bien inoculadas. El CTIFL (Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes) supervisa la producción y las plántulas micorrizadas con trufa identificable con un etiquetado específico (Fig.-21).



Fig.-21 Etiquetado específico para definir la calidad de planta micorrizada en Francia

El control comprende tres fases distintas durante la temporada de crecimiento y una auditoría de cumplimiento de la instalación.

Control de las trufas para la inoculación en planta

Identificación individual de todas las trufas con examen microscópico de la especie a inocular y estado de madurez de la espora, llevado a cabo por un agente del Ctifl. El objetivo es asegurar la especie inoculada y evitar el riesgo de "*T. indicum*" o "*T. brumale*."

Control de calidad forestal: este control lo realiza el viverista según normativa comunitaria. Ver tabla 4.

Tabla 4 Medidas establecidas en Francia para altura y diámetro de cuello en plantas micorrizadas

Edad planta (años)	1	1	2	2	2
Especies	Alt. mínima	Dtro. mínimo	Alt. mínima.	Alt. máxima	Dtro. mínimo
<i>Quercus pubescens.</i>	12 cm	4 mm	12 cm	60 cm	4 mm
<i>Quercus ilex</i>	15 cm	4 mm	15 cm	60 cm	4 mm
<i>Quercus robur</i>	20 cm	6 mm	20 cm	60 cm	6 mm
<i>Corylus avellana</i>	20 cm	5 mm	20 cm	60 cm	5 mm

El vivero tiene una clasificación previa antes de la aprobación de un agente del CTIFL y se compromete a presentar al mercado y controlar las plantas que cumplen con los criterios de calidad definidos.

Control de las plantas inoculadas: para plantas con uno o dos años y excepcionalmente plantas de tres años.

Un agente del CTIFL realiza el muestreo aleatorio tomando 10 plantas por lote (1000 plantas) y se evalúa cada lote por el método de Chevalier.

Los lotes de un año mal micorrizados (valores inferiores a 2,5) se pueden mantener y se vuelve a hacer el control al año siguiente. Si no lo pasa se destruyen los lotes.

Al final de la temporada, un agente de CTIFL hace una visita al vivero para comprobar la presencia de partidas rechazadas y garantizar que los lotes aceptados son los que se vendieron. Los lotes rechazados se destruyen en presencia del agente.

### **Italia**

La planta producida es controlada y certificada por la Universidad de L'Aquila, departamento de Ciencias ambientales o La Universidad de Perugia, Departamento de Biología Aplicada. Éstas realizan el control y la certificación de la planta micorrizada de varios viveros italianos y algunos franceses, emitiendo un certificado de validez del lote (Fig.-22).

La metodología utilizada está constituida por un método de observación y conteo de micorrizas (Bencivenga *et al.* 1987) y un método biomolecular.

La plantas micorrizadas van acompañadas siempre, de un pasaporte fitosanitario según normas CE (generos *Quercus*, *Pinus* o *Populus*) y una Certificación forestal Lex 269-73 (generos *Quercus*, *Pinus*, *Populus* o *Tilia*).



Prot n. 1029/P/2009

Perugia, 14 DIC. 2009

Spett.le Vivai Azzato  
 Contrada Prito n. 6  
 85050 Satriano di Lucania (PZ)

Oggetto: Certificazione di piante tartufigene.

A seguito di analisi morfologiche e biomolecolari, eseguite su campioni prelevati il 16/11/2009, presso il vivaio "Vivai Azzato" con sede a Satriano di Lucania (PZ), si dichiara che il lotto n. 04/09 di piante di *Quercus pubescens* Willd. costituito da 360 piante prodotte nel 2009, sono ben sviluppate, sane dal punto di vista fitosanitario, ben micorrizate da *Tuber melanosporum* Vittad. e pertanto si ritengono idonee ai fini della tartuficoltura.

Lotto n. 04/09      *Quercus pubescens*      n. piante 360      anno di produzione 2009

L'analista  
 Dott. Leonardo Baciarelli Falini

Il responsabile del laboratorio  
 Prof. Mattia Bendivenga

<b>Purità IVA (V.A.T.) n. IT 09448820548</b>	<b>Tel.</b>	<b>Fax.</b>		<b>Tel.</b>	<b>Fax</b>
> Sezione Biologia vegetale e Geobotanica		075.585.6404	Segreteria Amministrativa	075.585.7101	075.585.7122
> Sezione Botanica ambientale e applicata	075.585.6411	075.585.6423	"	075.585.7112	
> Sezione Genetica Agraria e Biotecnologia Genetica	075.585.6230	075.585.6224	"	075.585.6427	
> Sezione Microbiologia	075.585.6457	075.585.6470	"	075.585.6206	
> Sezione Scienze Zootechniche	075.585.7101	075.585.7122			

Fig.-22 Certificado emitido por la Universidad de Perugia declarando la idoneidad del lote para truficultura



## 2. Objetivos

Dada la existente falta de consenso entre el modo de evaluar la micorrización de una planta o lote de plantas, tanto a nivel nacional como a nivel mundial, y en base a las metodologías de evaluación más usadas, nos propusimos abarcar los siguientes objetivos:

- **Evaluación de las principales metodologías descritas para la determinación de micorrización en plantas de vivero.**
- **Establecer la correlación existente entre los diferentes métodos.**



## 3. Material y métodos

### 3.1 Diseño experimental

Para poder realizar la evaluación de las plantas con las diferentes metodologías se tomaron 12 por cada lote, 5 lotes/vivero en dos viveros de diferentes características. Esto supuso un total de 120 plantas.

#### **Vivero1:** V1

12 plantas/lote (5 lotes) = 60 plantas

Planta inoculada en abril de 2010 (1 año y 8 meses)

#### **Vivero2:** V2

12 plantas/lote (5 lotes) = 60 plantas

Planta inoculada en abril de 2011 (8 meses)

### 3.2 Selección de viveros y muestreo de lotes

La elección de los viveros de donde procede la planta micorrizada a evaluar, se realizó en base al conocimiento y relación personal que hay con cada uno de ellos, el grado de tecnificación de sus instalaciones y su producción anual de planta micorrizada.

El **vivero 1** (Fig.-23), posee unas instalaciones que le permiten producir alrededor de 300.000 plantas anuales. El contenedor utilizado es de 450 ml, individual montable, full-pot de ACUDAM.

El **vivero 2** (Fig.-24), posee unas instalaciones que le permiten producir alrededor de 40.000 plantas anuales. El contenedor utilizado es de 650 ml, bandejas de 12 contenedores troncocónico estriado. Bandeja de cultivo forestal Herku Ref. QP 12 T 18 de PROJAR.



Fig.-23 Vista general de las instalaciones Vivero 1, con capacidad para 300.000 plantas. Detalle del tipo de contenedor empleado.



Fig.-24: Vista general de las instalaciones Vivero 2, con capacidad para 40.000 plantas. Detalle del tipo de contenedor empleado.

La recogida de las plantas micorrizadas se realizó el 18 de noviembre de 2011, periodo en que son más visibles las hifas peritróficas y los cistidios que caracterizan morfológicamente la micorriza de *T. melanosporum* a nivel de especie (Bonet *et al.* 2001). La planta del vivero 1 fue inoculada en el mes de abril del 2009, mientras que la planta del vivero 2 se inoculó en abril del 2010, tiempo en el que supuestamente se han desarrollado adecuadamente formando un sistema radicular micorrizado idóneo para su venta y traslado a campo.

El muestreo para seleccionar todas las plantas a evaluar se realizó al azar, recogiendo 12 plantas por lote con la técnica del “salto de caballo”, como se puede observar en la figura 25.

Los lotes elegidos al azar del vivero 1 fueron los lotes 56, 10, 58, 55, 54 que a partir de ahora se denominaran correlativamente **1, 2, 3, 4, 5**.

Los lotes elegidos al azar del vivero 2 fueron los lotes 1, 7, 3, 6, 2 que a partir de ahora se denominaran correlativamente **6, 7, 8, 9,10**.



Fig.-25 Toma de muestras de planta micorrizada por el método “salto de caballo”.

### 3.3 Preparación de las muestras y mediciones biométricas

Partimos de una planta en cepellón en la cual sus raíces se han adaptado al volumen del recipiente que la contiene, bien entramadas en el sustrato. Dado que cada una de las 120 plantas debía ser analizada por los cinco métodos, los análisis se ordenaron de modo que un método no interfiriese con el siguiente.

La mayoría de los métodos usados en este trabajo para evaluar las plantas son destructivos, esto es, la planta se somete a una limpieza rigurosa a nivel de sistema radicular para poder manipularla y evaluarla según cada metodología aplicada. Sólo el método de CEAM-Valencia (Reyna *et al.* 1997), propone analizar un pequeño volumen del cepellón de la planta. En este sentido esta metodología ha sido elegida como la primera a emplear, tomando cilindros muestra de cada planta, para así poder posteriormente realizar una limpieza adecuada del sistema radicular de todas las plantas y someterlas al resto de metodologías.

Primeramente las plantas son etiquetadas con un código indicando el vivero al que pertenecen, al lote y el número de planta como se indica en la figura 26.



Fig.-26 Plantas procedentes de los dos viveros etiquetadas sobre la base del cuello.

Como se ha indicado en primer lugar, se extrae el cilindro de sustrato correspondiente al método de Reyna *et al.* (1997) de todas las plantas. Todos los cilindros se conservan a -20°C debidamente etiquetados hasta su análisis.

Acto seguido se realiza un lavado grosero (Fig.-27) de cada planta con objeto de asegurar la mínima pérdida de micorrizas. En un cubo con agua se introducen las plantas para ablandar el sustrato que rodea a las raíces y así de manera más sencilla ir eliminado la mayor parte del mismo, para posteriormente realizar un lavado más preciso.



**Fig.-27** Plantas sometidas a un lavado grosero para eliminar la mayor parte de sustrato.

Antes de proteger individualmente cada planta en una bolsa de plástico, se realizan las primeras mediciones para poder evaluar la calidad forestal de cada una. Estas mediciones según RD son el diámetro de la zona basal del tronco y la longitud de la parte aérea (Fig.-28 y 29).

Además se han tomado otras medidas como la longitud del sistema radicular, la esbeltez (Longitud tallo (cm)/diámetro cuello (mm)) y el volumen radicular (ml), que podrían servir para poder hacer algún tipo de análisis comparativo.

Sobre una hoja de cálculo, se van introduciendo los datos para su posterior tratamiento en un programa de análisis estadístico.

Por otro lado se anotaron posibles alteraciones relacionadas con la planta y su sistema radicular.

Una vez realizadas estas mediciones, las plantas son embolsadas individualmente y congeladas en cámara a  $-20^{\circ}\text{C}$ , dado que el número de plantas es alto como para realizar todos los análisis con la planta fresca. Si se mantienen vivas, la micorrización podría variar enormemente entre el primer y el último análisis (8 meses aproximadamente). Así pues, la congelación nos permite analizarlas con una mayor visión de conjunto durante un periodo más extenso sin apenas sufrir alteraciones en sus micorrizas.



**Fig.-28** Medición del diámetro del cuello de planta con calibre digital.

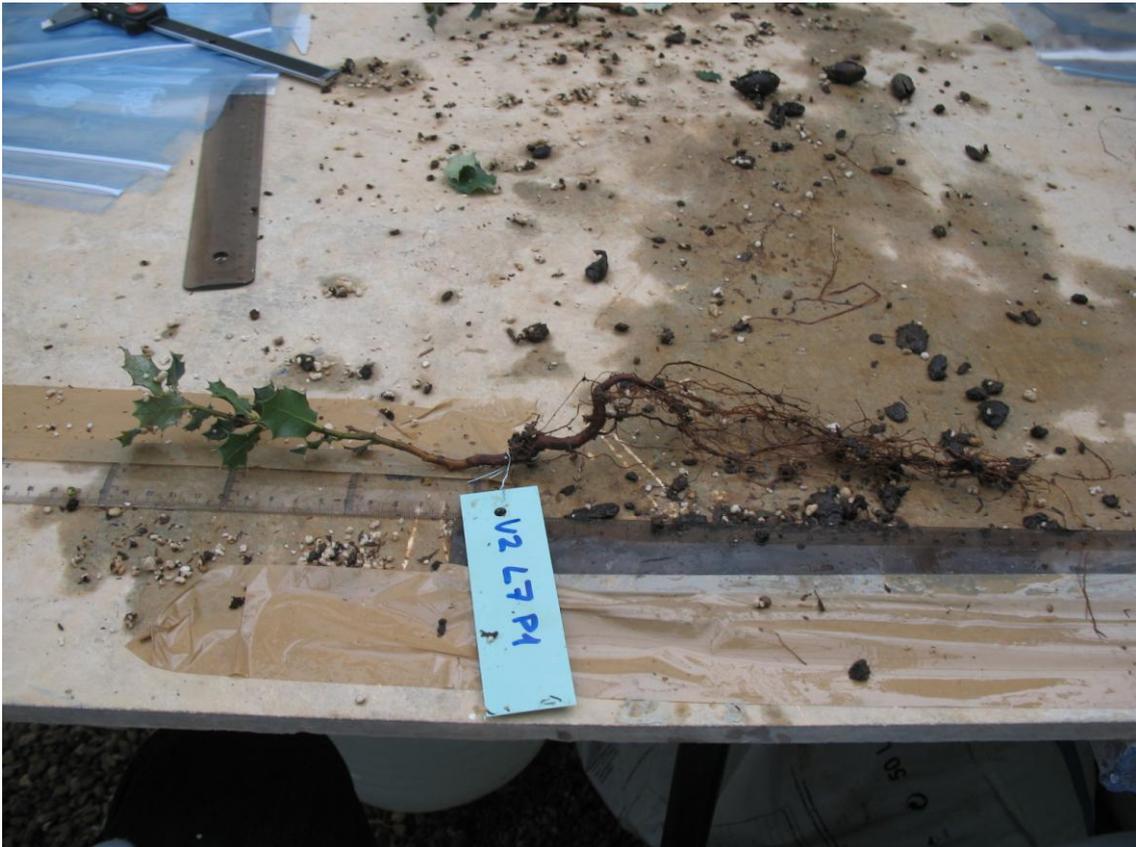


Fig.-29 Medición del sistema aéreo de la planta a partir del cuello.

### 3.4 Procesos comunes a todos los métodos aplicados

#### Descongelación por lotes de plantas para su evaluación

En cubetas, con el tamaño adecuado para cubrir con agua totalmente el sistema radicular de la planta, se dejan descongelar durante un periodo más bien corto (alrededor de 10 minutos).

#### Lavado delicado en bañera de ultrasonidos

Se introduce la cubeta que porta la planta o el cilindro de sustrato (método de Reyna et al. (1997) en una bañera de ultrasonidos, que es un dispositivo de limpieza que utiliza los ultrasonidos sobre un medio acuoso para intentar separar el sustrato adherido en las raíces de la planta. Se utilizó una solución de Tween 80 al 0,2% para facilitar el proceso de separación aunque resultó bastante ineficaz dado que el entramado de raíces con el sustrato era muy grande.

#### Medición aproximada del volumen radicular de cada planta

Una vez limpia la planta, se procede a medir el volumen radicular de cada una con ayuda de una probeta de 500 ml rellena hasta la división de 450 ml. Se introduce la planta y se mide la variación del volumen que ha tenido lugar al introducir la raíz de la

planta hasta la base del cuello (Fig.-30). Después de cada medida se rellena si es necesario al nivel de partida para la nueva lectura. Cuando se encuentran "conglomerados de sustrato con micorrizas" se intentan separar con las pinzas presionando sobre ellos para intentar disgregarlos lo más posible, sin romperlos.



**Fig.-30 Medición del volumen radicular de una planta en una probeta.**

### Primera observación de la planta.

Se evalúa, a simple vista, la calidad forestal, observando el desarrollo del sistema radical, para detectar posibles deformaciones morfológicas (Real Decreto 1220/2011, de 5 de septiembre).

Para todas las metodologías, se hace necesario una primera observación de la planta (Fig.-31), un vistazo orientativo con la ayuda de la lupa (microscopio estereoscópico) a 5-45 aumentos, incluso descartativo que permita tener una idea general de la micorrización de la planta (presencia o ausencia de raíces micorrizadas de *Tuber melanosporum*), si posee contaminantes u otras observaciones interesantes, como la distribución radicular en cantidad y calidad, la ubicación de las micorrizas y posibles fitopatías radicales). Con el microscopio (a 400 aumentos), además, se confirma cada tipo de ectomicorriza presente.

Esta primera observación podría descartar sin más análisis las plantas que no son válidas, bien por su pésima calidad forestal o bien por la falta de micorrizas de trufa negra, o exceso de contaminantes.



Fig.-31 Primera observación de la planta bajo la lupa o microscopio estereoscópico.

### 3.5 Evaluación de la planta de acuerdo a cada metodología

En función de la metodología aplicada a la evaluación de plantas se analizaban un número diferente de plantas por jornada, analizando lote a lote. Nada más sacar las plantas de la cámara a  $-20^{\circ}$ , se meten en pequeñas bañeras de plástico con agua, donde acaban por descongelarse y mantienen sus estructuras hasta que son analizadas (Fig.-32).

Como ya se ha comentado, por su carácter menos destructivo se comenzó evaluando plantas por el método de Reyna *et al.* (1997), extrayendo sólo, un volumen cilíndrico de sustrato con raíces, sin tocar el resto de la planta. Después el método de Chevalier *et al.* (1972), tras una limpieza de todo su sistema radicular se debe exponer dentro de un recipiente con agua y se observa bajo la lupa, sin cortar ninguna raíz. El siguiente método a emplear es el de Bencivenga *et al.* (1987) y el de Palazón *et al.* (1999); por su semejanza a la hora de tomar la muestra de raíces, en los cuales se toman fragmentos que contienen ápices y se realiza el conteo. Y por último el de método de Fischer y Colinas (1996), en el cual todas las raíces del sistema radicular se cortan en fragmentos de 3 mm para analizarlos, haciendo imposible que se pueda evaluar por los otros métodos una vez usado éste.

Todas las plantas se analizaron por un mismo método y de nuevo eran congeladas para conservarlas, salvo con el método de Bencivenga *et al.* (1987) y Palazón *et al.* (1999) que cada lote era evaluado por las dos metodologías antes de congelar.

En la tabla 5 y 6 se detallan los aspectos más importantes de cada método de evaluación, los cuales están recopilados al completo en el anejo de este trabajo.



Fig.- 32 Distribución y preparación de una muestra de un lote de plantas para ser analizado.

**Tabla 5 Resumen de las metodologías aplicadas a la evaluación de planta micorrizada.**

<b>DESCRIPTORES</b>	<b>INRA- ANVAR</b> (Chevalier <i>et al.</i> 1972)	<b>UNIVERSIDAD DE PERUGIA</b> (Bencivenga <i>et al.</i> 1987)	<b>UNIVERSIDAD DE LERIDA</b> (Fischer y Colinas 1996)	<b>INIA-ARAGON</b> (Palazón <i>et al.</i> 1999)	<b>CEAM-VALENCIA</b> (Reyna <i>et al.</i> 1997)
<b>Nº mínimo de raíces tróficas /planta</b>	No lo indica (Sistema radicular bien distribuido y uniforme)	400	900	300	No lo indica
<b>Nº mínimo de micorrizas de <i>T. melanosporum</i> /planta</b>	No lo indica	No lo indica	260	No lo indica	250
<b>Conteo ápices</b>	No cuenta	400 (50 ápices/raíz (4/sector))	250	300 (100/sección)	Todas las del cilindro
<b>Criterios de calidad forestal</b>	<b>D.E. (1999/105/CE)</b>	<b>L.R. del 6 de julio 2007, n. 10.</b>	<b>R.D. 1220/2011, de 5 de septiembre</b>	<b>R.D. 1220/2011, de 5 de septiembre</b>	<b>R.D. 1220/2011, de 5 de septiembre</b>
<b>Numero plantas a muestrear/Lote 1000</b>	10 (1%)	11(1,1%) Lotes<1000= 10 plantas	12(1,2%)	5(0.5%)	12(1.2%)
<b>Grado de micorrización o su estimación</b>	Media valores lote ≥ 2.5 (Chevalier 1972) Conversión ≥18.75% (Trouvelot, 1986)	≥30%	≥10%	≥30%	≥10%
<b>Estima el total del Nº de ápices micorrizados</b>	<b>no</b>	<b>no</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Si</b> >250 ápices micorrizados

Tabla 5 (cont.) Resumen de las metodologías aplicadas a la evaluación de planta micorrizada.

DESCRPTORES	INRA- ANVAR (Chevalier <i>et al.</i> 1972)	UNIVERSIDAD DE PERUGIA (Bencivenga <i>et al.</i> 1987)	UNIVERSIDAD DE LERIDA (Fischer y Colinas 1996)	INIA-ARAGON (Palazón <i>et al.</i> 1999)	CEAM-VALENCIA (Reyna <i>et al.</i> 1997)
% mínimo contaminantes	<10%	Diferencia de 20 puntos respecto al % de <i>Tm</i> , pero siempre $\leq$ 15%	<25% sobre nº ápices micorrizados	>30%	<20% del total de micorrizas de la planta <25% sobre el nº ápices micorrizados por <i>Tm</i>
% contaminación mínimo por otra <i>Tuber</i>	0%	0%	0%	0%	0%
Método destructivo	si	si	si	si	No
Tiempo medio observación/planta (estimación presente trabajo)	5,7 minutos	19,7 minutos	33,9 minutos	15,3 minutos	7,1 minutos
Validez de un LOTE (cumplidos los criterios de calidad forestal y 0% otra <i>Tuber</i> )	Media valor plantas >2,5 (Media (Trouvelot) > 19%)	$\geq$ 80% plantas validas	<b>Intervalos de confianza</b> Lim. Inferior raíces trof>1800 Todas plantas >%10 micrrz. <50% contaminates limite inferior % <i>Tm</i> >33% limite supr contam < 25%	Media $\geq$ 30%	$\geq$ 11 plantas micorrizadas con más de 100 ápices micor/planta.
Región o país de aplicación	Francia	Italia	Cataluña, Castilla León, Galicia, Castilla La Mancha y Murcia	Aragón, Andalucía	Comunidad Valenciana

**Tabla 6 Resumen del desarrollo de cada método de evaluación de planta empleado.**

<p><b>INRA- ANVAR</b> (Chevalier <i>et al.</i> 1972)</p>	<p><b>UNIVERSIDAD DE PERUGIA</b> (Bencivenga <i>et al.</i> 1987)</p>	<p><b>UNIVERSIDAD DE LERIDA</b> (Fischer y Colinas, 1996)</p>	<p><b>INIA-ARAGON</b> (Palazón <i>et al.</i>1999)</p>	<p><b>CEAM-VALENCIA</b> (Reyna <i>et al.</i>1997)</p>
<p><b>Labores preparatorias</b> Separación del sustrato de las raíces por medio de un lavado cuidadoso. Criterios de calidad forestal (diámetro de cuello, altura planta, examen del sistema radicular y aéreo según normativa). 1ª observación del sistema radicular de la planta cubierto por agua, bajo lupa (presencia de micorrizas del hongo inoculado y posibles contaminantes, cantidad y proporción de raíces). Identificación y comprobación al microscopio del hongo/s existentes en la planta.</p>			<p><b>Labores preparatorias</b> Separación del sustrato de las raíces por medio de un lavado cuidadoso. Criterios de calidad forestal (diámetro de cuello, altura planta, examen del sistema radicular y aéreo según RD).</p>	
<p>Observación bajo lupa de la cantidad de micorrizas y posibles contaminantes, estimando en una escala del 0 al 5 la aptitud de la planta.</p>	<p>Se utiliza una plantilla que se superpone a la planta y divide en dos sectores el aparato radical, del que se extraen al menos 4 raíces (desde unas ranuras que posee la plantilla) por sector y planta, examinando 50 ápices por cada fragmento de raíz extraído. Anotando los apices micorrizados, los no micorrizados y posibles contaminantes.</p>	<p>Se corta el sistema radical en segmentos de 2-3 mm, se colocan sobre una bandeja con una plantilla con cuadrículas de cuatro colores diferentes, se elige uno al azar y se cuentan los apices micorrizados, no micorrizados y posibles contaminantes presentes en ese color de cuadrícula, en un mínimo de 250 ápices radicales.</p>	<p>Se divide el sistema radical en tres partes longitudinalmente iguales (sectores). De cada uno de los sectores se extraen raíces al azar y se cuentan 100 ápices de cada, anotando ápices micorrizados, no micorrizados y posibles contaminantes. Se realiza el promedio de los 3 sectores.</p>	<p>Se obtiene una muestra del sistema radical de la parte central del cepellón (el 2% del volumen del contenedor) con un sacabocados. La muestra obtenida tras un delicado lavado, se pasa por un tamiz de 1 mm de luz, y se somete al recuento del número de ápices micorrizados, ápices sin micorrizar y micorrizas contaminantes.</p>

### 3.6. Diseño del análisis estadístico

Las variables objeto de estudio se han obtenido de 120 plantas; 60 plantas provienen de un vivero (V1) con una producción anual de 300.000 plantas micorrizadas y las otras 60 plantas de otro vivero (V2) con una producción anual de 40.000 plantas micorrizadas. Dado que la validación de la micorrización de plantas se lleva a cabo por lotes, se analizaron 12 plantas/Lote en 5 lotes en cada vivero.

#### Aptitud forestal, variables biométricas

En cada planta se midió: la altura del tallo (cm), la longitud del cepellón (cm), el diámetro del cuello (mm), el volumen radial (ml), y se calculó una nueva variable: esbeltez (cm/mm) a partir de valor de la altura del tallo y el diámetro del cuello. En todas estas variables biométricas se analizó su normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (test de Levene), transformándolas y/o extrayendo las observaciones aberrantes y outliers según convino, con el objeto de cumplir las premisas para los análisis paramétricos. Los valores mostrados en el apartado de resultados y discusión están sin transformar.

Las diferencias en las variables biométricas han sido testadas mediante ANOVA de un efecto fijo: Vivero, con bloques aleatorizados: Lotes. Las diferencias entre los bloques fue contrastada mediante el test post hoc de Tukey. El ajuste de las medias para múltiples comparaciones es el de Bonferroni.

#### Lotes

Los lotes se validaron de acuerdo con los cinco métodos de control de calidad de planta micorrizada mencionados, con el objeto de poner de manifiesto la coincidencia o discrepancia entre ellos con relación a la validación de los mismos lotes. Esta comparación se llevó a cabo con la prueba Q de Cochran.

De cada planta se calculó el porcentaje de micorrización mediante los cinco métodos de control de calidad, aplicando la equivalencia de Trouvelot *et al.* (1986) para transformar los datos del método de Chevalier *et al.* (1972) a porcentaje (ver anejo). Este parámetro es el uno de los más usados y característico de la calidad de la planta micorrizada. Conjuntamente con el tiempo empleado en la determinación del parámetro anterior, se construyó la matriz de correlaciones paramétricas de Pearson con las variables biométricas de las plantas.

El porcentaje de micorrización de cada planta ha sido transformado elevándolo a una potencia positiva. Con esta variable transformada se construyó la matriz de

correlaciones paramétrica de Pearson entre los métodos estudiados; y se contrastó la diferencia entre viveros mediante un ANCOVA de un factor fijo: vivero, y como covariable se utilizó el diámetro del cuello, tras observar correlación significativa entre ésta y el porcentaje de micorrización. Además se contrastó las diferencias debidas a los métodos de determinación en los lotes, mediante un ANOVA de un factor fijo: lote; las diferencias intra-lote se determinaron con el test post hoc de Tukey. El ajuste de las medias para múltiples comparaciones es el de Bonferroni.

Las diferencias en el tiempo empleado en la determinación del porcentaje de micorrización según los distintos métodos han sido contrastadas mediante métodos no paramétricos. Una vez ordenados los métodos en función del tiempo empleado en la determinación de la micorrización, se lleva a cabo una correlación no paramétrica Rho de Spearman, cuyo valor induce a pensar que los métodos en sí suponen una ordenación del tiempo, por ello se contrastan sus diferencias mediante la prueba Jonckheere-Terpstra. El análisis de las medias dos a dos de forma independiente se lleva a cabo mediante el test de la U de Mann-Whitney.

Los diseños y fundamentos de los test empleados pueden consultarse en (Montgomery, 2001), y su implementación se ha llevado a cabo con el paquete SPSS (2012).



## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Aptitud forestal y biometría

Los parámetros de calidad forestal de planta están asociados a variables relativas a su biometría (Tabla 7). Esta tabla se ha dividido entre los parámetros de calidad (diámetro en el cuello de la planta y altura del tallo) que indica el Real Decreto 1220/2011, de 5 de septiembre para evaluar calidad forestal de la planta y otros parámetros biométricos incorporados en el presente trabajo (esbeltez, volumen radicular y longitud del cepellón).

**Tabla 7 Medias mínimo cuadráticas de las variables biométricas según Vivero y Lotes. Se muestra el número de observaciones en las variables que ha sido necesario eliminar algún dato. Test de comparación de medias ANOVA de un efecto fijo (Vivero) bloqueado (Lote). Letras distintas ponen de manifiesto diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), medias sombreadas.**

Vivero	Lote	n	Altura tallo (cm)	n	Longitud cepellón (cm)	Diámetro cuello (mm)	Volumen Radical (ml)	n	Esbeltez (cm/mm)
V1	1	11	20,227	12	24,875	3,925	6,708	11	5,182
	2	12	17,333	12	24,708	3,808	6,167	11	4,336
	3	12	19,792	12	23,208	3,691	7,833	12	5,450
	4	12	20,792	12	24,750	3,649	9,058	11	5,527
	5	10	20,050	12	28,250	4,159	7,750	10	5,010
	Todos	57	19,639b	60	25,158a	3,847	7,503b	55	5,101b
V2	6	12	15,350	12	35,108	4,235	1,550a	12	3,667
	7	12	18,808	11	29,333	4,016	1,154a	12	4,700
	8	12	16,408	12	29,909	3,830	5,146b	12	4,317
	9	12	17,033	12	36,392	4,013	8,875c	12	4,258
	10	12	15,333	12	32,725	3,849	5,771b	12	4,092
	Todos	60	16,587a	59	32,693b	3,989	4,499a	60	4,207a

Los valores individuales por planta, así como los valores medios por lote, en cuanto a su diámetro y su altura, resultan adecuados conforme a la normativa aplicada sobre la calidad de planta forestal para ambos viveros con valores de altura de tallos (8-50cm) y diámetro del cuello entre 2-3mm (dependiendo de la edad de la planta).

El factor “vivero” influye directamente en el desarrollo de las plantas. La falta de datos sobre el manejo que lleva cada uno de los viveros o el tipo de sustrato empleado no permite establecer la causa de esta diferencia. Sin embargo el uso de un contenedor forestal de mayor capacidad (caso del vivero 2) podría influir directamente sobre el crecimiento de las encinas, como indican otros autores (Poorter *et al.* 2012). Las plantas del vivero 1, presentan alturas de tallo significativamente mayores que en el vivero 2, mientras que al comparar los diámetros de cuello resultan mayores las plantas producidas en el vivero 2, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Al unir ambas medidas para hallar la esbeltez aparecen valores significativamente menores en el vivero 2 y por lo tanto plántones mejor proporcionados. La esbeltez es un parámetro que afina más la calidad forestal de la planta, quizás mejor que la longitud y el diámetro del cuello por separado.

La diferencia de edad de las plantas (mayor en el vivero 1) no parece ser un factor que explique por encima del factor vivero las diferencias biométricas entre plantas. Sin embargo se observa que existen diferencias significativas respecto a la longitud, seguramente debidas a este factor.

Gráficamente, las figuras 33, 34, 35, 36 y 37 muestran las diferencias observadas en la tabla 8, respecto a los valores biométricos tanto entre viveros como en lotes del vivero.

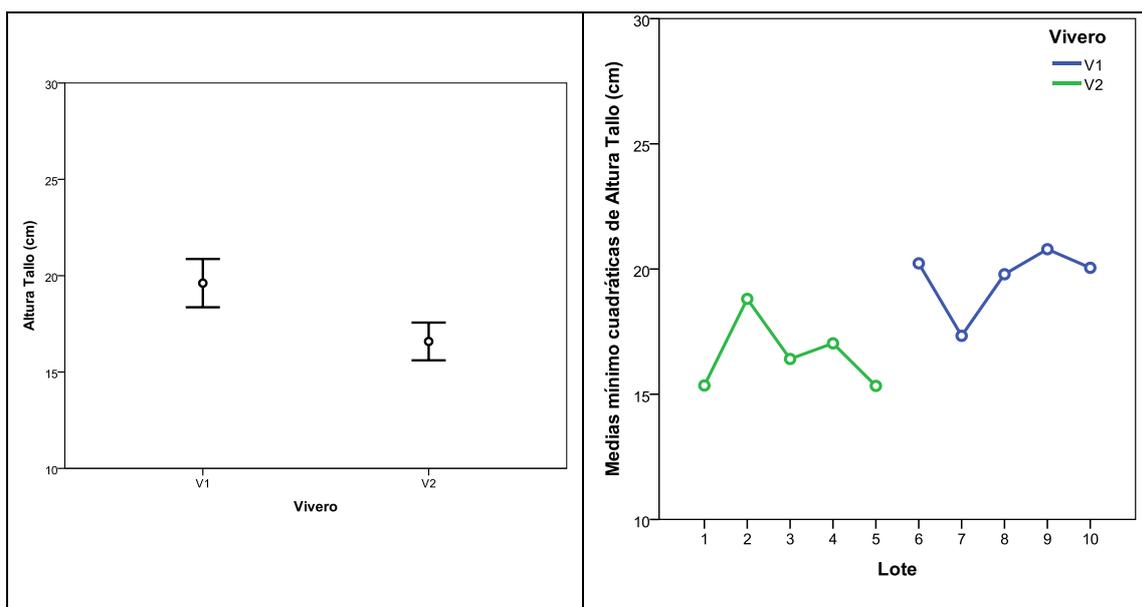


Fig.- 33 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% de la Altura del Tallo según viveros (izq.); Medias mínimo cuadráticas de la Altura del Tallo según lotes y viveros (dcha).

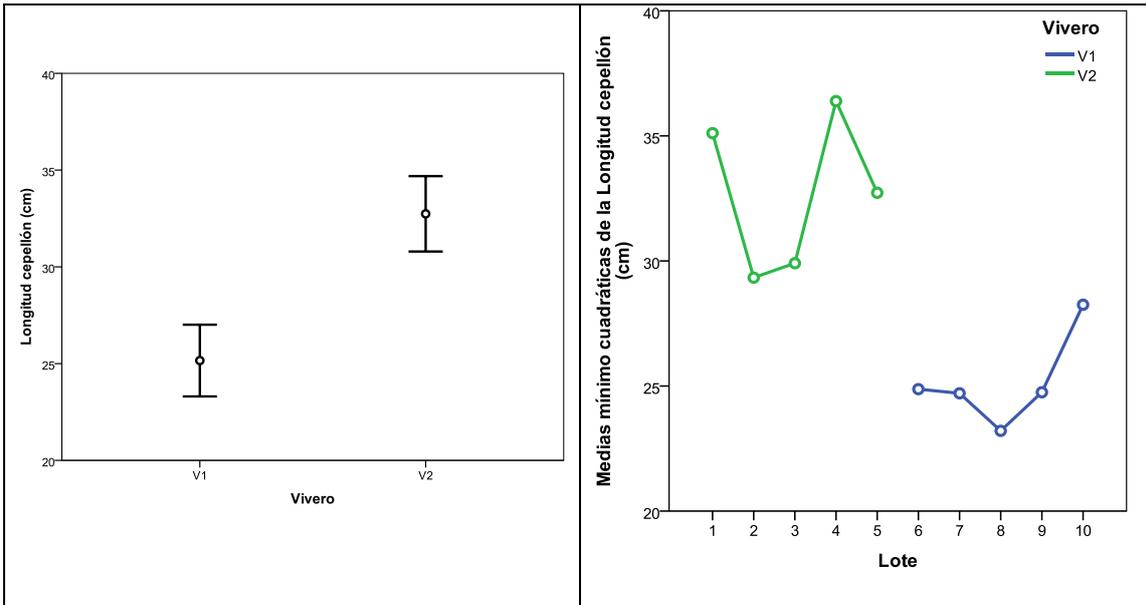


Fig.- 34 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% de la Longitud del cepellón según viveros (izq.); Medias mínimo cuadráticas de la Longitud del cepellón según lotes y viveros (dcha).

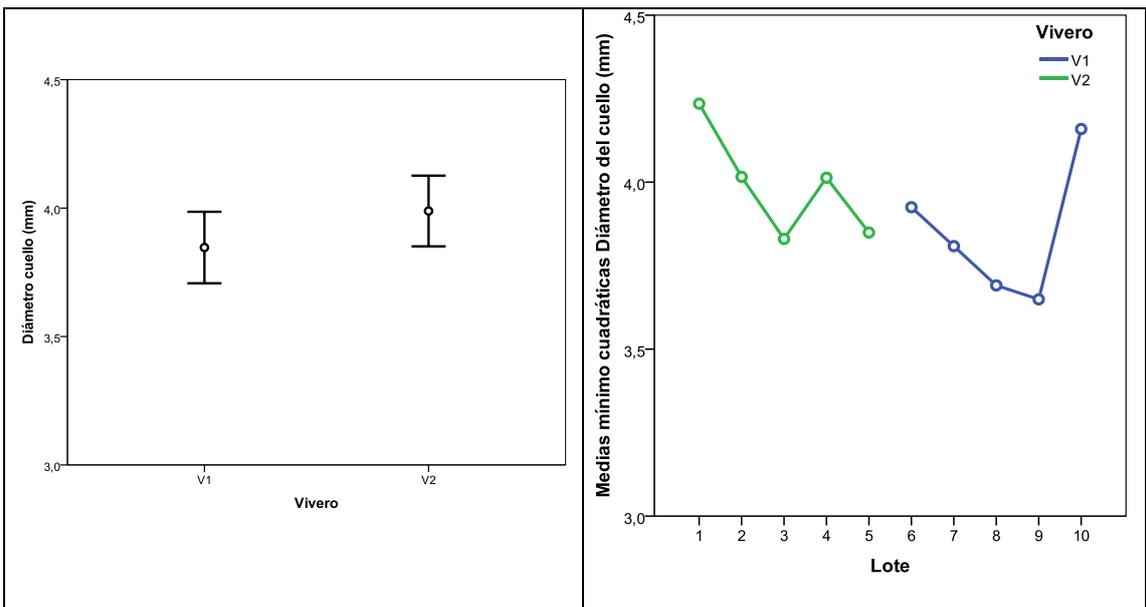


Fig.- 35 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% del Diámetro del cuello según viveros (izq.); Medias mínimo cuadráticas del Diámetro del cuello según lotes y viveros (dcha).

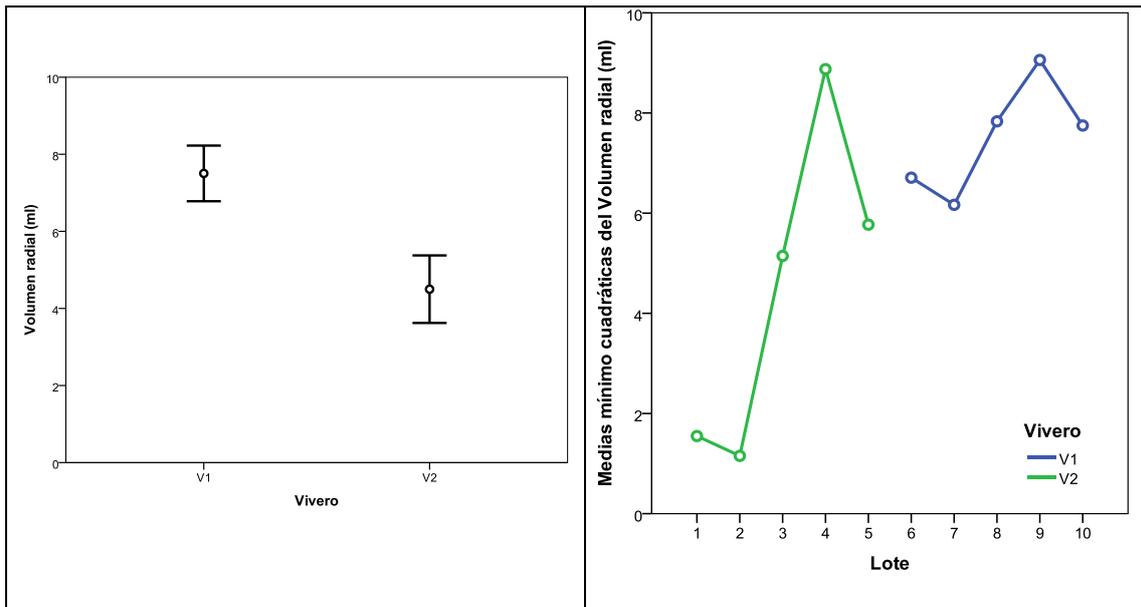


Fig.- 36 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% del Volumen radial según viveros (izq.); Medias mínimo cuadráticas del Volumen radial según lotes y viveros (dcha).

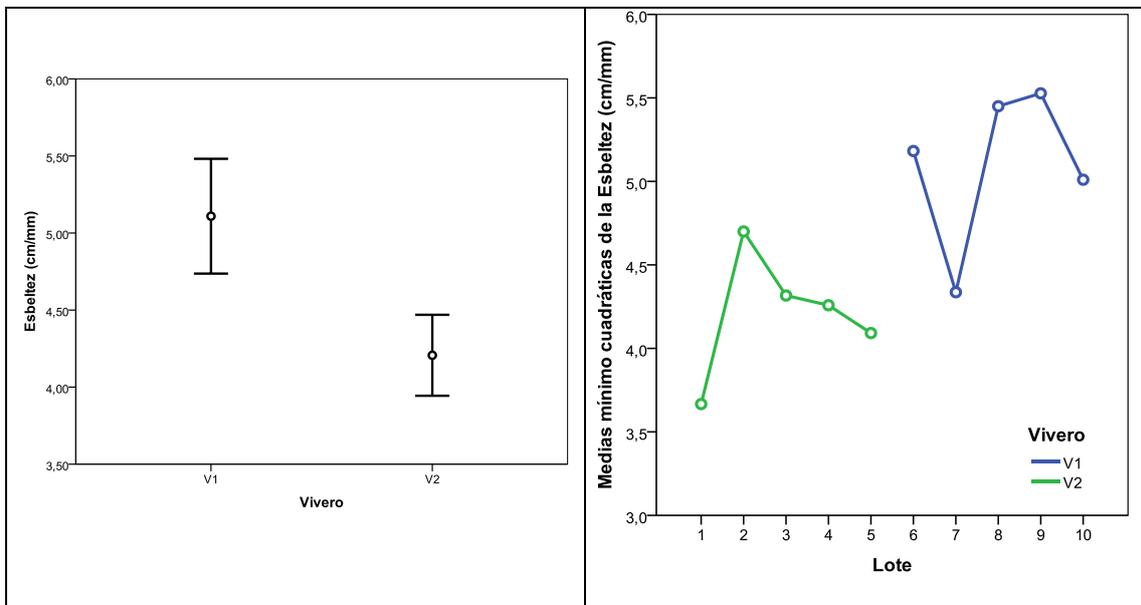


Fig.- 37 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% de la Esbeltez según viveros (izq.); Medias mínimo cuadráticas de la Esbeltez según lotes y viveros (dcha).

En la tabla 8 se presenta la matriz de correlaciones de las variables biométricas junto con el porcentaje de micorrización y el tiempo invertido en los análisis. De ella se pueden extraer algunas observaciones:

- El porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* encontrado en las plantas se correlaciona significativa y negativamente con el tiempo empleado en su determinación. Probablemente porque ambas variables están relacionadas con el método empleado en las evaluaciones, factor que incluiremos en análisis posteriores. Por otro lado, parece lógico que evaluar planta con una micorrización escasa, requiere una observación más exhaustiva del sistema, conllevando más tiempo de análisis. El

porcentaje de micorrización también se correlaciona significativa y positivamente con el diámetro del cuello, plantas con mayor desarrollo del cuello implican plantas mejor nutridas y con sistemas radiculares mejor formados, todo ello puede ser debido a una mayor micorrización (Ceruti, 1974, Honrubia *et al.* 1992). Estos datos son interesantes para posibles estudios en relación de la biometría con el grado de micorrización.

- La esbeltez de la planta se correlaciona positiva y significativamente con la altura del tallo y el volumen radical, mientras que lo hace negativa y significativamente con el diámetro del cuello y la longitud del cepellón, relación lógica por otra parte, puesto que la altura del tallo y el diámetro del cuello se emplean para calcularla.

- La altura del tallo se correlaciona positiva y significativamente con el volumen radial, mientras que lo hace negativa y significativamente con la longitud del cepellón. La longitud del cepellón se correlaciona negativa y significativamente con el volumen radial. Por diversas causas, morfológicas, el volumen del contenedor, el sustrato o la capacidad de autorepicado, entre otras, las plantas que tienen longitudes altas de raíces tienen menos raíces tróficas y por lo tanto menor volumen exploratorio para conseguir nutrientes y menor capacidad para ser susceptible de ser micorrizada.

El componente de heterogeneidad propia de cada planta es un factor importante en la cantidad y calidad del sistema radicular respecto a la proporción de raíces tróficas que posee.

**Tabla 8 Matriz de correlaciones entre las variables biométricas de las plantas, su porcentaje de micorrización y el tiempo empleado en su determinación. “r” es el momento-producto de Pearson; “p” es el nivel de significación y “n” es el número de observaciones.**

Variables		Micorrización (%)	Tiempo	Altura Tallo (cm)	Longitud cepellón (cm)	Diámetro cuello (cm)	Volumen radial	Esbeltez
Micorrización (%)	r	1	-0,212	0,029	0,046	0,152	-0,021	-0,045
	p		<0,001	0,478	0,258	<0,001	0,610	0,267
	N	120	600	600	600	600	600	600
Tiempo	r		1	0,005	-0,013	0,004	0,003	0,004
	p			0,908	0,757	0,930	0,951	0,920
	N		120	600	600	600	600	600
Altura Tallo (cm)	r			1	-0,111	0,058	0,310	0,875
	p				0,006	0,157	<0,001	<0,001
	N			120	600	600	600	600
Longitud cepellón (cm)	r				1	0,076	-0,104	-0,137
	p					0,062	0,011	0,001
	N				120	600	600	600
Diámetro cuello (cm)	r					1	0,031	-0,404
	p						0,446	<0,001
	N					120	600	600
Volumen radial	r						1	0,277
	p							<0,001
	N						120	600
Esbeltez	r							1
	p							
	N							120

## 4.2 Aptitud micorrícica

### 4.2.1 Porcentajes de micorrización de *Tuber melanosporum*

Los porcentajes de micorrización de *T. melanosporum* medios obtenidos para cada lote se muestran en la tabla 9. Dejando de lado, de momento, el método con el que se han evaluado, puede observarse que la micorrización en general de los lotes parece bastante aceptable, pues únicamente nueve evaluaciones de 50 han estado por debajo del 20% de micorrización, que es un valor promedio entre los porcentajes de micorrización mínimos requeridos por los diferentes métodos empleados, y solamente el promedio de uno de los lotes se encontró por debajo de ese valor (V1L2).

La tabla 10 muestra que el porcentaje de micorrización, promediado para los cinco métodos, es significativamente diferente según el vivero que produce la planta, siendo mayor en el Vivero 2 que en el Vivero 1.

Aun así, el modelo planteado explica muy poco (3.0%:  $R^2_{aj}=0.030$ ; 4,5%:  $R^2_{aj}=0.045$  si tenemos en cuenta el diámetro del cuello como covariable) de la variabilidad de las observaciones, puesto que son muchas las variables que condicionan una buena micorrización (manejo cultural, inoculo, sustrato, estado de la planta...) (Palazón 2012).

Tabla 9 Promedios por lote de los porcentajes de micorrización de *T. melanosporum* calculados para cada método y en global. Las medias inferiores al 20 por ciento aparecen sombreadas.

	Número de plantas	Reyna <i>et al.</i> (1997)	Chevalier <i>et al.</i> (1972)	Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	Fischer y Colinas (1996)	Palazón <i>et al.</i> (1999)	Media lotes
V1 L1	12	38,3	27,2	17,4	19,8	23,3	25,2
V1 L2	12	30,0	16,8	15,6	6,1	19,3	17,6
V1 L3	12	46,7	30,3	32,6	29,6	36,1	35,0
V1 L4	12	31,1	32,7	12,9	17,9	30,7	25,1
V1 L5	12	46,4	37,0	24,3	19,2	34,9	32,4
V2 L6	12	46,3	41,5	33,3	34,6	55,7	42,3
V2 L7	12	26,8	28,2	30,7	26,5	43,7	31,2
V2 L8	12	39,1	33,3	24,3	22,9	35,4	31,0
V2 L9	12	47,0	31,5	24,3	27,5	35,4	33,2
V2 L10	12	29,7	36,5	26,1	21,8	34,8	29,8

**Tabla 10 Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de micorrización según viveros. (1) Test de comparación de medias mediante ANOVA de un factor: vivero; (2) Test de comparación de medias mediante ANCOVA de un factor: vivero, y como covariable se utilizó el diámetro del cuello estimando un promedio de 3,9176 mm. SEM: error estándar de la media.**

Variables	Vivero		Probabilidad		
	V1	V2	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	SEM	TEC
Micorrización (%) (1)	27.04	33.47	0.030	1.50	<0.001
Micorrización (%) (2)	27.35	33.16	0.045	1.50	<0.001

Los resultados de aptitud en cuanto a micorrización en función del método empleado para evaluarla, para cada uno de los 10 lotes seleccionados, así como el porcentaje de micorrización medio de cada uno, se muestra en la tabla 11. La prueba Q de Cochran confirma la falta de relación entre el método empleado en la evaluación y la aptitud del lote que se evalúa (valor Q = 13,684 y p = 0.008). El consenso entre métodos únicamente sucede en los lotes con mayor cantidad de micorrización (lotes 1 y 8, con un 42.3% y 33.8% de micorrización media respectivamente) y menor (lote 7, 18.9%). En los otros 7 lotes el resultado difiere en función del método aplicado en la evaluación. El método más permisivo parece ser el de Chevalier *et al.* (1972) con 9 de 10 lotes aptos y el menos el de con 3.

**Tabla 11 Aptitud del lote según los métodos estudiados para ser aceptado o rechazado para su distribución como planta micorrizada. Porcentaje medio de micorrización de cada lote.**

Lote	Micorrización (%)	Reyna <i>et al.</i> (1997)	Chevalier <i>et al.</i> (1972)	Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	(Palazón <i>et al.</i> (1999)	Fischer y Colinas (1996)
1	40,26	si	si	si	si	si
2	31,00	no	si	si	si	si
3	30,00	no	si	no	no	si
4	33,00	si	si	no	si	si
5	30,00	si	si	no	no	si
6	24,00	si	si	no	no	no
7	16,00	no	no	no	no	no
8	34,00	si	si	si	si	si
9	25,00	no	si	no	no	si
10	31,00	si	si	no	no	si
<b>TOTAL</b>		6	9	3	4	8

Los lotes de planta micorrizada con *T. melanosporum* producidos en los viveros europeos, en función de la zona en la que pretendan ser plantados, pueden ser sometidos a los cinco diferentes métodos de evaluación que han sido estudiados en el presente trabajo y, a la vista de los resultados obtenidos, la obtención del permiso de venta depende del método aplicado. Este hecho provoca la necesidad imperiosa de llegar a un acuerdo entre todos los organismos certificadores. Todos los métodos son capaces de aceptar o rechazar cierto lote cuando éste tiene una micorrización excelente o muy pobre, respectivamente. Sin embargo la mayor parte de la producción parece encontrarse en unas condiciones de micorrización medias, precisamente en el intervalo de falta de consenso entre los métodos.

El estudio de correlación entre métodos en cuanto al porcentaje de micorrización obtenido para cada planta (Tabla 12) muestra la existencia de correlación significativa y positiva entre todos los métodos entre sí, a excepción del método de Reyna *et al.* (1997) que sólo está correlacionado con el de Bencivenga *et al.* (1987). El mayor coeficiente de correlación se encontró entre el método de Palazón *et al.* (1999) y el de Fischer y Colinas (1996): 0.662 y el menor entre Chevalier *et al.* (1972) y Bencivenga *et al.* (1987): 0.399.

**Tabla 12 Matriz de correlaciones entre los métodos que evalúan la calidad de planta micorrizada, sobre el porcentaje de micorrización de las plantas. “r”: producto-momento de Pearson; “p”: significación; y “N”: número de observaciones. Correlaciones significativas sombreadas.**

Métodos		Fischer y Colinas (1996)	Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	Chevalier <i>et al.</i> (1972)	Palazón <i>et al.</i> (1999)	Reyna <i>et al.</i> (1997)
Fischer y Colinas (1996)	r	1	0,554	0,593	0,662	0,147
	p		<0,001	<0,001	<0,001	0,108
	N	120	120	120	120	120
Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	r		1	0,399	0,610	0,215
	p			<0,001	<0,001	0,019
	N		120	120	120	120
Chevalier <i>et al.</i> (1972)	r			1	0,594	0,114
	p				<0,001	0,214
	N			120	120	120
Palazón <i>et al.</i> (1999)	r				1	0,162
	p					0,078
	N				120	120
Reyna <i>et al.</i> (1997)	r					1
	p					
	N					120

Existen diferencias significativas entre las estimaciones del porcentaje de micorrización obtenida por cada método (Fig.- 38 y Tabla 13):  $R^2_{aj} = 0,104$ ; SEM= 2.19;

$p = <0.001$ . Éstos aparecen agrupados en tres grupos homogéneos: Fischer y Colinas (1996) y Bencivenga *et al.* (1987), con el menor porcentaje de micorrización, Chevalier *et al.* (1972) con un porcentaje medio y Palazón *et al.* (1999) y Reyna *et al.* (1997) que estiman los porcentajes de micorrización más altos.

Según Gógán (2011) todos los métodos tienden a sobreestimar el porcentaje de micorrización real de las plantas, por lo que Fischer y Colinas (1996) y Bencivenga *et al.* (1987), que obtienen los valores de micorrización más bajos, podrían ser los que proporcionen un valor más fiable en cuanto a este parámetro. Ambos métodos usan plantillas, por lo que es muy probable que el rastreo del sistema radical que efectúan sea más homogéneo que en los otros tres casos, en los que bien por ser un tanto subjetivos (Chevalier *et al.* 1972 y Palazón *et al.* 1999) o por tomar la muestra de raíz en una zona muy concreta (Reyna *et al.* 1997) quizás con mayor concentración de micorrizas que otras, la micorrización podría sobreestimarse en mayor grado. Los porcentajes de micorrización calculados para cada planta con cada método están correlacionados entre sí, con la única excepción del método de Reyna *et al.* (1997), el cual muestrea únicamente una zona concreta de la raíz aunque, junto con el método de Fischer y Colinas (1996), es el único capaz de estimar el número total de ápices de cada planta y además es el único no destructivo, con lo que es muy útil en investigación para realizar monitorizaciones individualizadas de plantas.

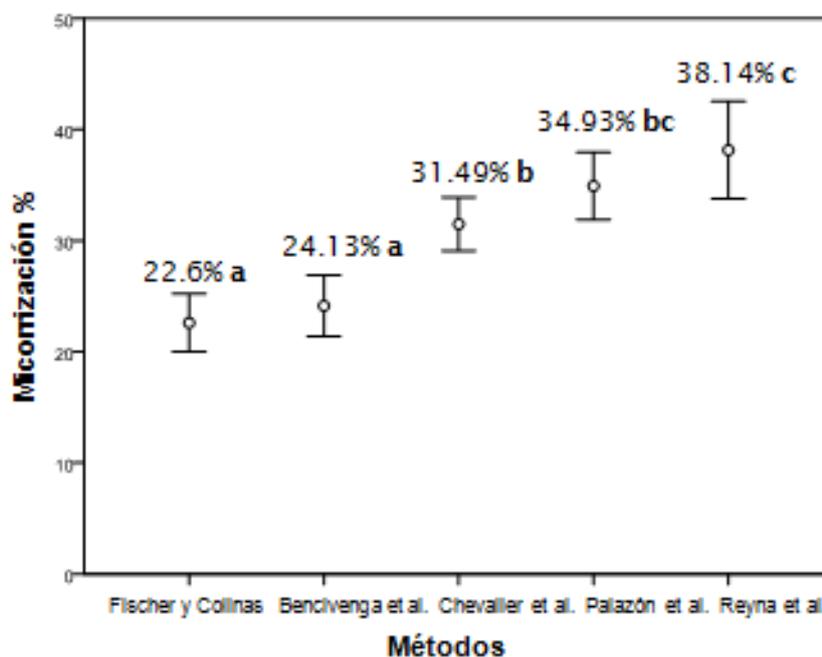


Fig.- 38 Representación gráfica del porcentaje de micorrización (intervalo de confianza,  $\alpha = 0.05$ ) obtenido por los cinco métodos evaluado. Se incluyen las pruebas para cada método y los resultados del test de Tukey de la tabla 13.

Tabla 13 Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de micorrización según el método empleado en su determinación. Test de comparación de medias ANCOVA de un factor fijo: método (1), y como covariable el diámetro del cuello (2) evaluado como promedio en un valor de 3,9176 mm. Diferentes letras evidencian diferencias significativas entre los métodos contrastadas mediante el test post hoc de Tukey. SEM: error estándar de la media.

Variables	Métodos					Probabilidad		
	Fischer y Colinas (1996)	Bencivenga et al. (1987)	Chevalier et al. (1972)	Palazón et al. (1999)	Reyna et al. (1997).	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	SEM	M
Micorrización (%) (1)	22.60a	24.13a	31.49b	34.93bc	38.14c	0.104	2.19	<0.001
Micorrización (%) (2)	22.60a	24.13a	31.49b	34.93bc	38.14c	0.126	2.19	<0.001

En la figura 39, representamos el intervalo de confianza (95%) del porcentaje de micorrización obtenido a través de los distintos métodos y según el vivero donde se han obtenido las plantas. A la vista de los intervalos generados se puede afirmar que cada vivero tiene lotes de plantas significativamente distintos en cuanto a resultados del porcentaje de micorrización.

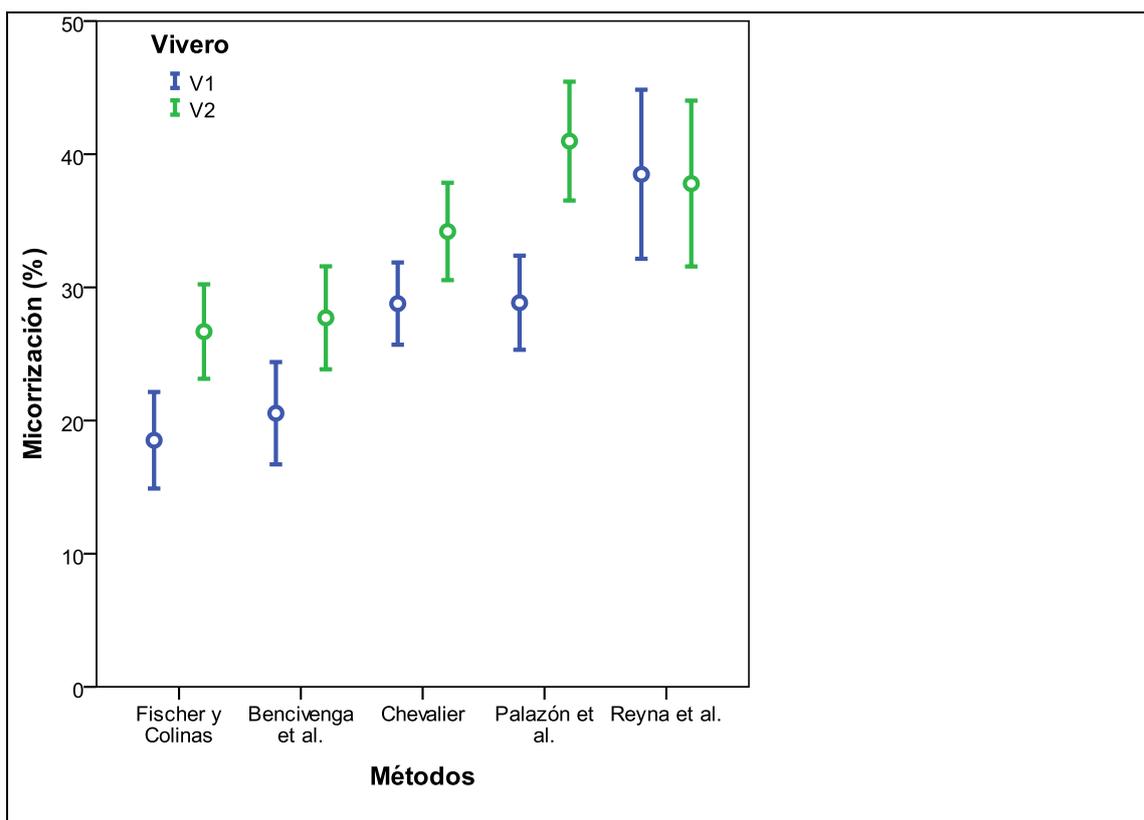


Fig.- 39 Representación gráfica del intervalo de confianza ( $\alpha = 0,05$ ) del porcentaje de micorrización obtenido a través de los distintos métodos en cada uno de los viveros.

Además, cada método evalúa el porcentaje de micorrización diferenciando los lotes de cada vivero, excepto cuando evaluamos con el método de Reyna et al. (1997) que no detecta la diferencias entre lotes de un vivero y otro. Esta evidencia muestra que no es

cierto, ya que un vivero micorriza mejor que el otro y que así se demuestra empleando los otros métodos.

De este modo afirmamos que el vivero influye significativamente en el porcentaje de micorrización detectado a través de métodos cuyos resultados también son significativamente distintos, pudiéndose observar tres conjuntos diferenciados entre ellos. La interacción entre los viveros y los métodos empleados en la determinación del porcentaje de micorrización no es significativa (Tabla 14).

De nuevo aunque se han conseguido ver ciertos efectos significativos, éstos apenas consiguen explicar la variabilidad detectada en el porcentaje de micorrización. Los métodos por si mismos explican un 10,4% esta variabilidad, subiendo hasta el 12,6% si se añade el diámetro del cuello de la planta como covariable. Si añadimos la variabilidad del vivero se aumenta hasta el 14,2% (Tabla14) subiendo hasta el 15,7% al añadir el diámetro del cuello. Con todo ello se ha demostrado la clara influencia del método empleado y el vivero sobre el porcentaje de micorrización resultante, pero el ruido que ejerce la heterogeneidad de cada planta es enorme. En España, el uso de bellota certificada procedente de una misma localización no evita esta variabilidad inherente al empleo de semilla como material de reproducción. Algo que se intenta solucionar en otros países con el empleo de clones adaptados a los diferentes medios.

**Tabla 14 Medias mínimo cuadráticas del porcentaje de micorrización según los métodos usados para calcularlo y los diferentes viveros. Resultados del ANCOVA (Modelo General Lineal) de acuerdo a los métodos (M) y a los viveros (V) y su interacción (MxV) (1). Diferentes letras evidencian diferencias significativas entre los métodos, contrastadas mediante el test post-hoc de Tukey. Como covariable se incluye el diámetro del cuello (2) evaluado como promedio en un valor estimado de 3.9176 mm. SEM: error estándar de la media.**

Variables	Métodos					Viveros	
	Fischer y Colinas (1996)	Bencivenga et al. (1987)	Chevalier et al. (1972)	Palazón et al. (1999)	Reyna et al. (1997).	V1	V2
Micorrización (%) (1)	22.60a	24.13a	31.49b	34.93bc	38.14c	27.04	33.47
Micorrización (%) (2)	22.60a	24.13a	31.49b	34.93bc	38.14c	27.35	33.16

Variables	Probabilidad				
	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	SEM	M	V	M × V
Micorrización (%) (1)	0.142	2.17	<0.001	<0.001	0.056
Micorrización (%) (2)	0.157	2.16	<0.001	<0.001	0.052

#### 4.2.2 Aptitud hongos contaminantes

La ausencia de hongos contaminantes en las plantas micorrizadas es un factor importante en la calidad de las mismas, puesto que puede perjudicar al crecimiento del hongo inoculado. Aún así, como estipulan las diferentes metodologías, hay una cierta tolerancia a la presencia de algunos de ellos, siempre que no pertenezcan al género *Tuber*, lo cual se podría considerar un fraude.

En algunas plantas de los lotes correspondientes al vivero 1 (Tabla.-15) se encontraron ectomicorrizas contaminantes. Principalmente se detectó *Sphaerospora brunnea*, el hongo contaminante más frecuente en vivero de planta micorrizada con especies de trufa (Donnini *et al.* 1997). Las plantas en las que este hongo esta presente suelen tener una colonización por el hongo inoculado, más baja que el resto. Aunque al llevar la planta a campo estas ectomicorrizas desaparecen por ser menos competitivas en esas condiciones (Sánchez, 2012). También se detectaron otros hongos ectomicorrízicos que no pudieron ser identificados. Para el resto de lotes, los del vivero 2, se observa que carecen de contaminantes.

En ningún caso se observaron ectomicorrizas de especies del género *Tuber* distintas de *T. melanosporum*.

Es significativo que empleando ciertos métodos de evaluación, como el de Reyna *et al.*, no se haya observado la presencia de ningún contaminante. Mientras que con los otros métodos sobre todo con el método de Fischer y Colinas (1998), Bencivenga *et al.* (1987) o Palazón *et al.* (1999), que son más exhaustivos con la visión conjunta de todo su sistema radicular, seamos capaces de apreciar la presencia de contaminantes.

**Tabla 15** Resultados sobre la presencia de contaminantes en las plantas analizadas en algunas plantas de los lotes del vivero 1. AC/TA: Ápices contaminados/Ápices muestreados. %: porcentaje estimado de contaminaciones. L (Lote), P (Planta).

MÉTODOS	Reyna <i>et al.</i> (1997)	Chevalier <i>et al.</i> (1972)	Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	Palazón <i>et al.</i> (1999)	Fisher y Colinas (1996)	Hongo ectomicorrízico contaminante
MUESTRAS	AC/TM	%	AC/TM	AC/TM	AC/TM	
L1 P1		1%	48/400			Hongo ectomicorrízico no determinado
L2P3			32/400	12/300	64/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>
L2P4			44/400	15/300	4/250	Hongo ectomicorrízico no determinado
L2P6			140/400	24/300	94/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>
L2P7					2/250	Hongo ectomicorrízico no determinado
L2P8					3/250	Hongo ectomicorrízico no determinado
L2P10		3%	140/400		33/250	Hongo ectomicorrízico no determinado
L3P2		10%	32/400	9/300	8/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>
L3P11					1/250	Hongo ectomicorrízico no determinado
L4P6		5%				Hongo ectomicorrízico no determinado
L4P9		5%				Hongo ectomicorrízico no determinado
L4P12			12/400		12/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>
L5P2		10%	60/400	25/300	85/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>
L5P3		4%	12/400			Hongo ectomicorrízico no determinado
L5P11					2/250	<i>Sphaerospora brunnea</i>

La contaminación en ningún caso, no ha sido un factor para eliminar algún lote, los porcentajes establecidos de contaminantes para cada método no descartan estos lotes por estos motivos.

#### 4.3 Análisis del tiempo invertido en determinar el porcentaje de micorrización según los métodos estudiados

En la tabla 16 y en la figura 40, se puede apreciar el tiempo medio necesario para analizar una planta por las diferentes metodologías. El tiempo invertido en la evaluación de cada lote (tiempo por planta mas número de plantas a evaluar), por su repercusión económica, es un factor con una gran importancia.

Tabla 16 Medias y desviación estándar del tiempo empleado para la determinación del porcentaje de micorrización de las plantas estudiadas según los métodos para la evaluación de la calidad de planta micorrizada. Letras distintas evidencian diferencias significativas conforme al test de la U de Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

Variables	Métodos				
	Chevalier <i>et al.</i> (1972)	Reyna <i>et al.</i> (1997).	Palazón <i>et al.</i> (1999)	Bencivenga <i>et al.</i> (1987)	Fischer y Colinas (1996)
Tiempo (min)	5,68 ± 1,13a	7,18 ± 1,08b	15,25 ± 2,02c	19,72 ± 1,87d	33,90 ± 3,30e

Ordenando los métodos, de menor a mayor, según el tiempo empleado en la determinación del porcentaje de micorrización se observa una muy alta correlación con el tiempo (Rho de Spearman: 0,939;  $p < 0,001$ ). Esto induce a pensar que los propios métodos suponen una ordenación del tiempo empleado, de modo que este es significativamente distinto según el método empleado (Estadístico de J-T tipificado = 27,410;  $p < 0,001$ ).

El método más rápido para analizar plantas micorrizadas es el de Chevalier *et al.* (1972), ya que consiste en analizarla de manera general y subjetiva, siempre y cuando se posea una cierta experiencia y conocimiento de hongos ectomicorrícicos. El método que conlleva más tiempo para analizar una planta es el de Fischer y Colinas (1996), puesto que requiere de una serie de labores preparatorias y de observación mucho más elaboradas.

Una observación interesante en referencia al tiempo de análisis, sería el empleado utilizado en la limpieza del sistema radicular de la planta. A veces el sustrato utilizado por el viverista puede complicarlo; esto es, una planta en un sustrato con componente principal de turba negra, hace casi imposible una limpieza exhaustiva, ni siquiera un

baño de ultrasonidos o el uso de un detergente tipo Tween, puede separar las raíces y glomérulos que se concentran en la turba.

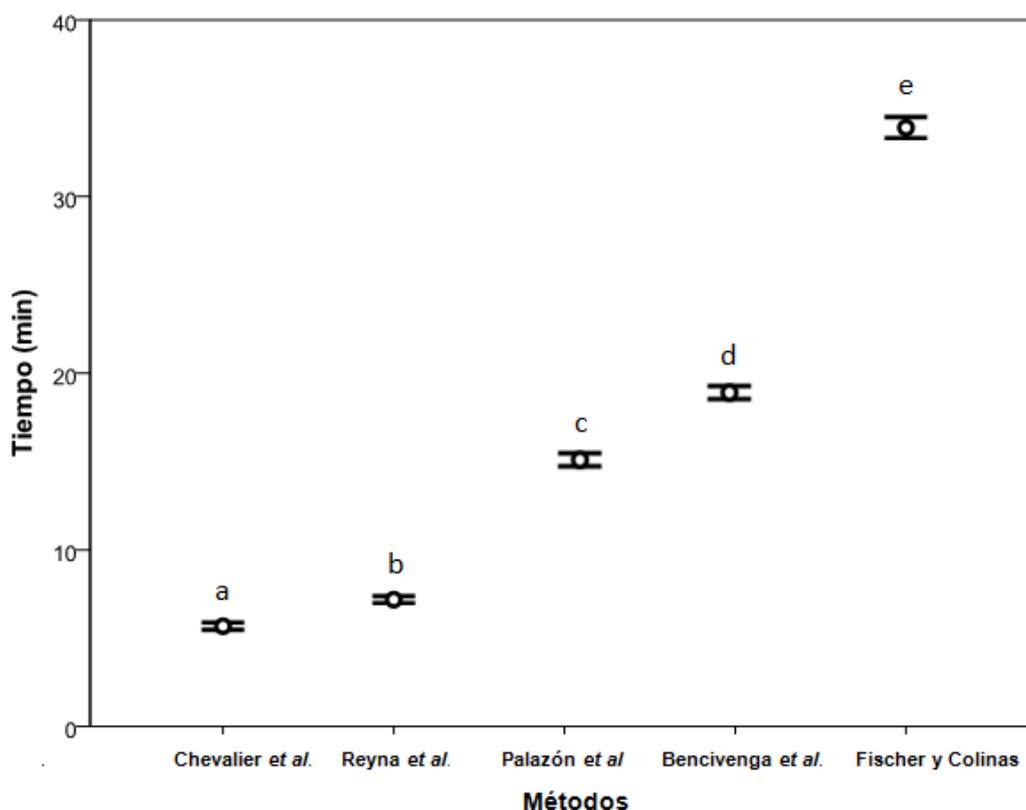


Fig.- 40 Representación gráfica del intervalo de confianza al 95% del tiempo empleado en la determinación del porcentaje de micorrización de las plantas estudiadas según los métodos de certificación de la calidad de planta micorrizada.

#### 4.4. Discusión de los diferentes métodos

Cada laboratorio evaluador de planta emplea por rutina un único método, en nuestro caso un único operador los ha empleado todos, por lo que pueden extraerse diferentes ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, las cuales, se exponen a continuación.

##### 4.4.1 Metodología CEAM-Valencia (España) Reyna et al. (1997)

Este método es un método rápido, sencillo y además no destructivo, en el cual, las plantas que son sometidas a la extracción de raíces son capaces de recuperarse fácilmente, lo cual permite seguimientos individualizados de las mismas en cualquier tipo de ensayo o prueba que se desee realizar.

Ya es sabido que existe gran heterogeneidad en la morfología del sistema radicular de las plantas que componen un lote al tratarse de plantas procedentes de semilla y,

además, su lento crecimiento no ayuda a la composición de un sistema radicular bien formado, ocupando mas uniformemente el contenedor. Para evaluar por este método las plantas deberían cumplir esto último. En plantas de raíces “abanderadas”, puede que el sistema radicular no este homogéneamente distribuido y del punto de muestreo no obtengamos ninguna raíz ni micorrizas.

Tampoco se pueden observar algunos parámetros de calidad forestal (Fig.- 41), como la conformación del sistema radicular y posibles contaminantes en otros sectores del contenedor.

El empleo de un aplicador fitosanitario de presión ha favorecido mucho la limpieza de las muestras para su posterior análisis.



Fig.- 41 El sistema radícula de esta planta no cumple con los criterios de calidad forestal, sin embargo con el método de Reyna *et al.* (1997) no podemos apreciarlo.

#### 4.4.2 Metodología INRA-ANVAR (Francia) Chevalier *et al.* (1972)

Es un método de análisis para evaluar plantas muy rápido y sencillo. Sin embargo, este método estimatorio depende mucho de la experiencia del observador, es un

método muy subjetivo. Es necesario una especialización alta del personal que analiza la planta micorrizada al microscopio estereoscópico y experiencia en la evaluación de plantas por otras metodologías más objetivas, en definitiva se necesita experiencia demostrada para un análisis correcto con esta metodología.

Sólo se analiza el porcentaje de micorrización de la planta y el porcentaje de contaminantes, sin obtener datos objetivos cuantitativos.

A veces un sistema radicular muy ramificado o muy compacto es difícil de observarlo con precisión, teniendo en muchas ocasiones que girarlo sobre la cubeta de agua, y modificando la visibilidad por la turbidez del agua alcanzada e incluso dañando su sistema radicular.

Para poder comparar con las otras mediciones de los otros métodos de certificación, Trouvelot *et al.* (1986) realizó una conversión a porcentaje referente a la escala del 1-5 propuesta por Chevalier *et al.* (1972), empleada en el presente trabajo como ya se comentó en Material y Métodos.

#### **4.4.3 Metodología Universidad de Perugia (Italia) Bencivenga *et al.* (1995)**

La posibilidad de usar este tipo plantilla no facilita el muestreo de raíces, puesto que en algunos casos, la extracción de raíces de entre las ranuras señaladas de las plantillas era costosa en tiempo y en algunos casos, como en fragmentos de raíces con muchos ápices pequeños podían romperse al extraerlos. Por otra parte, la elección de los fragmentos radiculares se hacía en base a la posición de la ranura, evitando en gran medida, la elección de las mejores raíces en cuanto a volumen y cantidad de raíces tróficas.

Dada la heterogeneidad que presentan los sistemas radiculares se hace complicado centrar el sistema radicular sobre la plantilla y menos con un plantilla no transparente como se indica en el procedimiento. Puesto que algunos sistemas radiculares presentaban formas “abanderadas”, haciéndose casi imposible la distribución homogénea de la plantilla sobre la raíz como se puede observar en la figura 42.

En algunas plantas con sistemas radiculares pobres, es complicado tomar las raíces para poder observarlas y hacer el conteo.

Al superponer la plantilla sobre la planta puede ocurrir que en la base del tallo haya muchísimos ápices de *T. melanosporum* que no entren en la distribución de los cuadrados que forman la plantilla o glómérulos que tengan muchos ápices micorrizados y no se pueda realizar el conteo o éste sea incompleto.

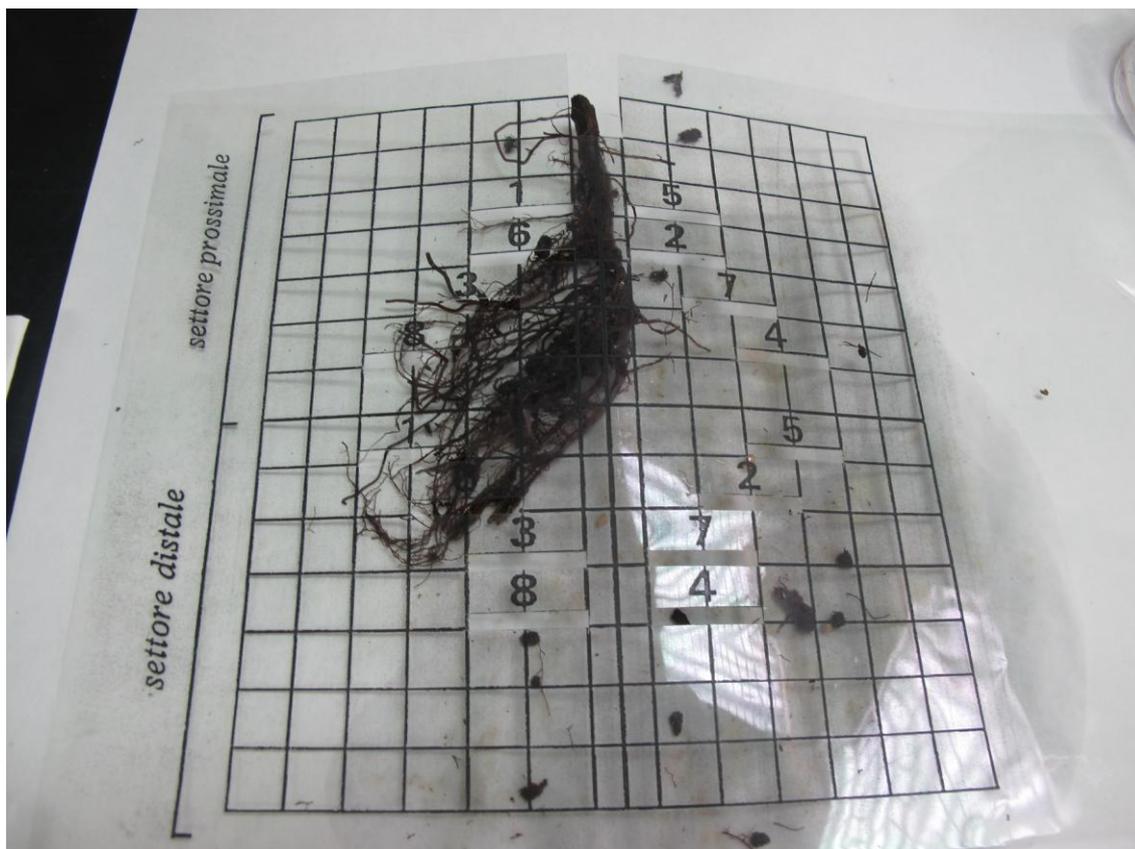


Fig.-42 Planta con el sistema radicular abanderado bajo la plantilla del método italiano.

Actualmente, en Italia ya no se utiliza la plantilla y se recogen 6 raíces de la parte superior y 6 de la inferior, o sea 600 raíces. Contando en cada una 50 ápices. Fue, en el Congreso Internacional de Truficultura celebrado en 2013 en Teruel (España), donde se expusieron estos cambios. Anteriormente se añadió también en el Congresso Internazionale di Tartuficoltura di Spoleto (Italia), celebrado en 2008. El trabajo de laboratorio de la presente memoria finalizó con anterioridad al congreso de Teruel, por lo que el nuevo método italiano no pudo incluirse en los análisis, aunque el cambio realizado por los mismos autores es indicativo de los problemas derivados del empleo de este tipo de plantilla que anteriormente hemos comentado.

#### 4.4.4 Metodología INIA–Aragón (España) Palazón *et al.* (1999)

El elegir bajo criterio propio, sin uso de plantilla, los fragmentos para evaluar, puede incorporar cierta subjetividad al método, puesto que el observador tiende a coger los fragmentos de raíz con mas ápices radiculares para conseguir un conteo más rápido o porque ve que existen más ápices micorrizados. Este puede ser el motivo de los porcentajes de micorrización mayores que se observan mediante su uso, únicamente superados por los de Reyna *et al.* 1997. De todos modos, al igual que en otro caso de

análisis con parte de subjetividad, la correlación encontrada entre los porcentajes de micorrización estimados prueba su validez.

Al muestrear un lote, parece escaso tomar 5 plantas (0,5%) como muestra significativa de todo un lote, puesto que pierde robustez estadística.

Es un método muy sencillo, aunque destructivo, podría implementarse al método una hoja de cálculo para el procesamiento y recopilación de datos de forma más cómoda.

#### **4.4.5 Metodología Universidad de Lérida (España) Fischer y Colinas (1996).**

La certificación de lotes de planta colonizados por micorrizas de *Tuber* es un proceso destructivo y laborioso, por lo que es importante muestrear el mínimo número de plantas necesario para satisfacer los requerimientos estadísticos que establecen si se cumple el criterio.

Las dos primeras fases de este método permiten a un analista bien formado rechazar rápida y sistemáticamente plantas y lotes que obviamente no cumplirán los criterios establecidos, y reduce el tiempo necesario del proceso de conteo de ápices.

Si las plantas en un lote dado aparecen homogéneas y tienen buena colonización por la trufa y escasos contaminantes, el analista puede comenzar a calcular los intervalos de confianza del lote a partir de la quinta planta en lugar de completar las 12. En lotes bien micorrizados son suficientes cinco plantas para tener la certeza de que se cumplen los criterios de certificación con la consiguiente reducción de costes para el viverista.

Respecto a los otros métodos, este es el más costoso en tiempo de los utilizados para evaluar planta. Un hecho importante es el tiempo de observación que conlleva examinar un lote completo, puesto que con un tiempo de más de 3 horas no se puede evaluar completamente el lote y el observador puede acusar un cierto cansancio ocular que no le permita evaluar correctamente, mientras que con los otros métodos el tiempo de evaluación es inferior a 3 horas, en algunos casos considerablemente, como es el caso del de Chevalier *et al.* (1972).

En este método se hace importante una lupa con alta resolución para poder ver con gran claridad las raíces dentro de cada cuadro de muestreo de la plantilla empleada en este método y así la fatiga ocular es menor.

El empleo de una hoja de cálculo, tanto en la introducción de datos como en el procesamiento, hace que este método sea ordenado y eficaz para la evaluación tanto por planta como por lote.

El empleo de una plantilla y la forma de muestreo de este método hace que la elección de las raíces sea totalmente al azar y que las zonas con más raíces o micorrizas no sean preferiblemente elegidas como pueda pasar en otros métodos.

#### **4.4.6 Discusión general sobre los métodos utilizados**

Por sencillez de método y por tiempo de evaluación el método de Chevalier *et al.* (1972) es un método muy interesante, aunque se precisa de un operador cualificado para determinar con precisión el análisis. Además de poder evaluar también posibles contaminantes de esta manera tan subjetiva, no es recomendable para operadores noveles. Puede tildarse, con razón, de ser muy subjetivo, sin embargo su correlación, estadísticamente significativa, con el resto de métodos excepto uno, valida su empleo. La metodología de Reyna *et al.* (1987) es también rápida, aunque dado que no podemos observar todo el conjunto radicular de la planta, podemos caer en el error de aceptar plantas con contaminantes. La observación en referencia a la calidad forestal de la planta también ofrece dudas a la hora de su análisis por la misma razón, dado que no se puede observar todo el sistema radicular en su conjunto.

Con los métodos de Bencivenga *et al.* (1987) y Palazón *et al.* (1999) cuesta analizar la planta tiempos similares, además el método de Bencivenga *et al.* (1987) ofrece una plantilla que para un operador noble facilita el trabajo, aunque el propio uso de la plantilla prolonga el tiempo de análisis.

Por último, el método de Fischer y Colinas (1996) es el que más tiempo lleva, por su metodología de conteo de ápices sobre una plantilla, previo recorte de raíces de la planta. Es un método que requiere de cierto esfuerzo visual y, por nuestra experiencia, obliga a descansar con mayor frecuencia que el resto.

El método recomendado para personas que se inician en la evaluación de planta micorrizada sería un método objetivo, sistemático y que le permita realizar conteos de manera clara y definida. El método de Fischer y Colinas (1996), es un método que ofrece las características anteriores para un analista noble. Sin embargo, es un método largo y pesado en cuanto al tiempo que cuesta analizar una planta. Una persona más experimentada podría utilizar los métodos de Bencivenga o Palazón que son métodos más rápidos de muestreo. Un analista muy experimentado puede ser

capaz con el método de Reyna *et al.* (1972) de evaluar en muy poco tiempo y de manera bastante exacta la validez de la planta.

En todos los casos los equipos (lupa y microscopio óptico) deben ser de la mayor calidad posible, puesto que el trabajo del analista será más eficiente y con menor error de estimación.

El mejor método está por determinar todavía, pero debe ser sencillo de realizar, en tiempo y medios, además de efectivo en sus análisis y, a poder ser, no destructivo. En vías de llegar a un acuerdo entre todos los organismos certificadores, quizás la mejor opción sea combinar dos métodos correlacionados. Esto es, usar el método de Chevalier *et al.* (1972) siempre que no haya dudas sobre la presencia de contaminantes y su grado de micorrización sea alto. En el resto de casos emplear un método sencillo como el de Palazón *et al.* (1996) para asegurar que el porcentaje es adecuado. En cuanto a este porcentaje “adecuado”, sería necesario consensuarlo con el apoyo de resultados en campo para justificar estos niveles.

Dada la similitud de las ectomicorrizas de *T. melanosporum* y *T. indicum* en todos sus estadios y la de *T. melanosporum* y *T. brumale* cuando son jóvenes y no han desarrollado cistidios aún, un método nuevo debe incorporar análisis moleculares rutinarios que garanticen la ausencia de sus micorrizas en los lotes. Principalmente en el caso de *T. indicum*, su presencia, además de fraudulenta, podría suponer un grave riesgo ecológico para el resto de *Tuber* europeas por tratarse de una especie alóctona, como ya se detalló en la introducción. En su momento se propuso controlar todo el inóculo que emplean los viveros, como se hace en Francia, pero en nuestro país, el gran número de empresas en el sector y el secretismo ligado a los métodos de inoculación dificulta ese tipo de acciones. Además debe tenerse en cuenta que la pretensión es certificar el producto final, es decir, la planta micorrizada. Las especies involucradas ya pueden identificarse molecularmente a nivel de carpóforo y de micorrizas. Algunas técnicas moleculares ya están puestas a punto: empleo de cebadores de PCR específicos (Paolocci *et al.* 1997, Mabru *et al.* 2001; Suz *et al.* 2006), PCR-RFLP (Pérez-Collazos *et al.* 2009) o PCR a Tiempo Real (Sánchez, 2012; Parladé *et al.* 2013). Pero aún no está claro qué técnica elegir, por su fiabilidad y su facilidad de aplicación en análisis rutinarios a gran escala, ni el modo en que deben muestrearse las plantas, es decir, cuántos ápices seleccionar, en qué zonas de la raíz, o incluso, si la mejor opción sería estudiar el micelio extraradical presente en el propio sustrato (Suz *et al.* 2006; Parladé *et al.* 2013).

# 1. Conclusiones

1. Los métodos de Fischer y Colinas (1996) y Bencivenga *et al.* (1995) valoran los lotes con porcentajes de micorrización significativamente menores que el resto y conllevan mayor tiempo de análisis.
2. El método de Reyna *et al.* valora a las plantas con porcentaje de micorrización mas altos, no correlacionados con ninguno de los otros cuatro métodos que, a su vez, si se correlacionan entre sí.
3. Sólo cuando los lotes son de muy buena o muy mala calidad de micorrización todos los métodos de evaluación coinciden al valorar su aptitud. Lo que implica la clara necesidad de llegar a un acuerdo en la unificación de criterios para la evaluación de planta micorrizada en Europa.
4. El diámetro del cuello de la encina está correlacionado con el porcentaje de micorrización, por lo que podría ser un parámetro a tener en cuenta en la evaluación de la calidad de micorrización además de la calidad forestal.



## 6. Bibliografía y Webgrafía

- Agerer R, Rambold G (2004–2013)** [first posted on 2004-06-01; most recent update: 2011-01-10]. DEEMY–An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. [www.deemy.de](http://www.deemy.de) – München, Germany
- Baciarelli F, Donnini D, Di Massimo G, Bencivenga M (2009)** Università di Perugia: 20 anni di controllo e certificazione di piante tartufigene. Perugia
- Bencivenga M, Calandra R, Granetti B (1990)** Ricerche sui terreni e sulla flora delle tartufaie naturali di *Tuber melanosporum* Vitt. dell'Italia centrale. In: Atti del II Congresso internazionale sul tartufo. Spoleto, 24 - 27 novembre 1988. Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano. Ed., Spoleto: 337-374
- Bencivenga M, Donnini D, Tanfulli M, Guiducci M (1995)** Tecnica di campionamento delle radici e degli apici per la valutazione delle piante micorrizate. *Micol. Ital.*, 2: 35-47
- Bernal J (2011)** Cultivo *in vitro* y descripción morfológica del hongo *Tuber melanosporum* Vittad. Trabajo Fin de Carrera Ingeniero Agrónomo (inédito) Universidad de Zaragoza. 85 pp
- Boletín Oficial de la Región de Emilia-Romagna (2012)** – PARTE segunda - N. 43
- Bonet A (2004)** Secondary succession of semi-arid Mediterranean old-fields in south-eastern Spain: insights for conservation and restoration of degraded lands. *Journal of Arid Environments* 56: 213-233
- Bonito G, Trappe J, Donovan S, Vilgalys R (2011)** The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with North American host plants and complete its life cycle in non-native soils. *Fungal ecology*, 4(1): 83-93
- Boyer JN, Duba SE, South DB (1987)** Emergence timing affects root-collar diameter and mortality in loblolly pine seedbeds. *New Forests* 1(2):135-140
- Cartié G, Palazón C, Barriuso J, Delgado I (1996)** Efecto de parasitismo CD; p. 199 (8 pp)
- Ceruti A (1960)** Elaphomycetales et Tuberales. *Iconographie Mycologique Bresadola* Suppl. II, Trento. 100 páginas
- Cocina L, Barriuso J, Martín M, Sánchez S (2013)** A review of nurseries producing mycorrhizal plants in Spain and the world. I Congreso Internacional de Truficultura, Teruel 2013
- Chavasse CGR (1980)** Planting stock quality: a review of factors affecting performance. *New Zealand J. of Forestry Sci.*, 25: 144-171

- Chevalier G, Grente J (1978)** Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne. Production a grande échelle de plantes mycorhizes par la truffe (*Tuber melanosporum* Vittad. ). Mushroom science, 10:483-505
- De Miguel AM, Sáez R (2005)** Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas. Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 16: 1-18
- Del Campo AD, Navarro RM (2004)** Calidad de lotes comerciales de encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp.). Evaluación de su respuesta en campo. Cuadernos de la S.E.C.F. 17: 35-42
- Di Massimo G, García-Montero LG, Manjón JL, Díez J (1996)** Hongos micorrícicos competidores de *Tuber nigrum* Bull (= *T. melanosporum* Vittad.), presentes en ecosistemas naturales y viveros del centro de España. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid, 21: 189-199
- Donnini D, Bencivenga M, Calandra R, Tanfulli M (1997)** Influenza della reazione del substrato sulla micorrizzazione di *Ostrya carpinifolia* Scop. con *Tuber melanosporum* Vitt. e *Sphaerospora brunnea* (A. e S.) Svrcek e Kubicka. Micologia Italiana, 3:17-22
- Fischer C, Colinas C (1996)** Methodology for certification of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum* for commercial application. 1st International Conference on Mycorrhizae. Berkeley (California), USA August, 1996
- Folk RS, Grossnickle SC (1997c)** Determining field performance potential with the use of limiting environmental conditions. New Forests 13: 121-138
- Fontana A (1971)** Il micelio di *T. Melanosporum* Vitt. in coltura pura. Allionia, 17: 19-23
- Geng LY, Wang XH, Yu FQ, Deng XJ, Tian XF, Shi XF, Xie XD, Liu PG, Shen Y (2009)** Mycorrhizal synthesis of *Tuber indicum* with two indigenous hosts, *Castanea mollissima* and *Pinus armandii*. Mycorrhiza, 19(7): 461-467
- Giraud M (1988)** Prévèlement et analyse de mycorhizes. CTIFL. La Truffe. Pp. 49-63 FNPT. Juliet, 1988 - n° 10 Congrès de la trufficulture. Saintes, 27-28, Novembre, 1987. Ed. Charles PARRA
- Gógán A (2011)** Studies on cultivation possibilities of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) and smooth black truffle (*Tuber macrosporum* Vittad.) in Hungary. PHD THESIS. Páginas 6 y 7
- Gonzalez B, Caverro R, De Miguel A (2005)** Diversidad florística en la zonas truferas de Navarra. IV Congreso forestal español (CD de actas). Zaragoza, 26-30 de septiembre
- Grossnickle SC, Folk RS (1993)** Stock quality assessment: forecasting survival and performance on a reforestation site. Tree Planters' Notes, 44: 113-121

- Hacskeylo E, Vosso JA (1971)** Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. *Forest Science* 17, 239-241
- Honrubia M, Torres P, Díaz G, Cano A (1992)** Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Proyecto LUCDEME VIII ICONA
- Kües U, Martin F (2011)** On the road to understanding truffles in the underground. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 555–560
- Meotto F, Carraturo P, Dana M (1992)** Valutazione in pieno campo e in serra della competitività di *Sphaerosporella brunnea* con *Tuber magnatum*. *L' Informatore Agrario*, 48:73-78
- Meotto F, Carraturo P (1988)** Ectomicorrizia di *Sphaerosporella brunnea* (A. & S.) Svrcek & Kubicka in piantine tartufigene. *Allionia*, 28: 109-116
- Mexal JG, Landis TD (1990)** Target seedling concepts: height and diameter. En: *Target Seedling*
- Mikola P (1969)** Mycorrhizal fungi of exotic forest plantations. *Karstenia* 10, 169-176
- Montecchi A, Sarasini M (2000)** *Funghi ipogei d'Europa*. Associazione Micologica Bresadola Trento. 714 páginas
- Montgomery DC (2001)**. *Design and Analysis of Experiments*. New York (USA), John Wiley & Sons, Inc
- Moser M (1958)** Die künstliche Mykorrhizaimpfiung an Forstpflanzen. I. Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen. *Forstwissenschaftlich Centralblatt* 77, 32-40
- Murat C, Zampieri E, Vizzini A, Bonfante P (2008)**. Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dread it and it has happened! *New Phytologist*, 178: 699-702
- Navarro RM, Del Campo A, Alejano R, Álvarez I (1998)** Caracterización de calidad final de planta de encina (*Quercus ilex* L), alcornoque (*Q. suber* L), algarrobo (*Ceratonia siliqua* L), acebuche (*Olea europaea* L. var. *sylvestris*), en cinco viveros de Andalucía
- Navarro RM, Del Campo AD (2005)** Evaluación de la calidad de lotes comerciales de encina (*Quercus ilex* L. subs. *ballota* (Desf.) y acebuche (*Olea europaea* var. *sylvestris* Brot.): tres años de ensayos. IV Congreso Forestal Español, Zaragoza, 26-30 Sep. Vol. abstracts + CD; p. 199 (8 pp)
- Oliach D, Bonet JA, Ficher C, Olivera A, Martínez J, Colinas C (2008)** Estado actual de la trufa y la truficultura. *Dossier Tècnic* 26
- Palazón C, Delgado I, Cartié G, Barriuso J, Esteban H (1999)** Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* ssp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt., para la obtención, en España, de la etiqueta de

certificación. 5.º Congreso Internacional Science et culture de la Truffe. Aix-en-Provence (Francia)

**Palazón C, Delgado I, Cartié G, Barriuso J (1997)** Metodología del análisis de planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. Reunión sobre truficultura. Zaragoza, 1997

**Palenzona M, Rebaudengo E, Tocci A, Zambonelli A (1987)** Valutazione dello stato di micorrizzazione in piantine tartufigene. Proposta di un metodo. Ministero Agricoltura e Foreste: pp. 14

**Peñuelas J (1993)** «Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas». Montes, 33:84-97

**Poorter H, Bühler J, Van Dusschoten D, Climent J, Postma JA (2012)**. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth

**Rausher T, Agerer R, Chevalier G (1995)** Ektomykorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. Nova Hedwigia

**Reyna S (2007)** Truficultura. Fundamentos y técnicas. Ed. Mundiprensa. 668 pp

**Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolucci F (2008)** *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. New Phytologist, 180: 466–478

**RiOUSset L, Chevalier G, Bardet, MC (2001)** Truffes d'Europe et de Chine. Ed. INRA, Paris, 181 páginas

**Ritchie, GA (1984)** Assessing seedling quality, pp. 243-259. In: Duryea, M. L. and Landis, T. D. (Eds.): Forest Nursery Manual: Production of Bareroot Seedlings. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers. The Hague

**Rivera CS (2009)** Caracterización, descontaminación y conservación de *Tuber melanosporum* (trufa negra) y *Tuber aestivum* (trufa de verano). Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. 371 pp

**Rose RW, Royo A, Pardos M (1998)** La planta ideal: revision del concepto, parametros definitorios e implementacion practica. Investigacion. Agraria.: Sistemas. Recursos. Forestales. Vol. 7 (1 y 2)

**Sánchez S (2012)** Ectomicorrizas en el cultivo de trufa negra: ecología, diversidad y gestión. Doctoral dissertation. Universidad de Zaragoza

**Scagel R, Bowden R, Madill M, Kooistra C (1993)** Provincial seedling stock type selection and ordering guidelines. British Columbia. Min. of Forests. SD404.P76. 76 pp

**Shemakhanova NM (1962)** Mycotrophy of Woody Plants. US Department of Commerce Translation TT66-51073 (1967), Washington, DC, USA.

- Smith SE, Read DJ (2008)** Mycorrhizal symbiosis. Academic press. 787 pag
- Sourzat P (2004)** Questions d'écologie appliquées à la trufficulture. Lycée professionnel agricole et viticole de Cahors - Le Montat, Cahors - Le Montat
- SPSS (2012)** IBM SPSS Advanced Statistics 21. New York (USA), IBM Corporation
- Steel R, Torrie J (1980)** Principles and procedures of statistics: A biometrical approach McGraw-Hill (New York) xxi, 633 p
- Stoeckeler, JH Slabauch PE (1965)** Conifer Nursery Practice in the Prairie Plains. US Department of Agriculture Handbook No. 279, USA
- Takacs EA (1967)** Producción de cultivos puros de hongos micorrizógenos en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Castelar. IDIA Supplement of Forestry 4, 83
- Theodorou C, Bowen GD (1973)** Inoculation of seeds and soil with basidiospores of mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry 5, 765-771
- Thompson B (1985)** Seedling morphological evaluation. What can you tell by looking. En: Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major test. Duryea, M., ed. Forest Research Laboratory. Oregon State University, pp. 59-69
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986)** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Dans: Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes, Dijon, 1985. INRA (éd.), pp. 217-221
- Wilde SA (1944)** Mycorrhizae and silviculture. Journal of Forestry 42, 290
- Yang C (1999)** Truffles in southwest China. Actes du V Congrès International: Science et culture de la truffe. Marzo de 1999. Aix-en- Provence. pp: 248-249
- Wang Y, Peigui L, Chen J, Hung-Tao H (2007)** China - a newly emerging truffle-producing nation. Actes du colloque: La culture de la truffe dans le monde. Brive-La Gaillarde. pp: 35-44
- Zambonelli A, Salomoni S, Pisi A (1993)** Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. Micol Ital 3:73-90
- Zambonelli A, Brazanti B (1987)** Competizione fra di funghi ectomicorrizici *Tuber albidum* e *Laccaria laccata*. Micol ital 3: 159-164

**DEEMY** An Information System for Characterization and Determination of EctoMycorrhizae. Recuperado el día 20 julio de 2013 de [http://www.deemy.de/Determinacion de ectomicorrizas](http://www.deemy.de/Determinacion%20de%20ectomicorrizas)

**FLORA IBERICA.** Recuperado el día 4 de Abril de 2012 de [http// www.floraiberica.es/PHP/generos\\_lista.php](http://www.floraiberica.es/PHP/generos_lista.php)

**ÍNDICE FUNGORUM** Recuperado el día 24 de Mayo de 2012 de <http://www.indexfungorum.org>

**MYCORRHIZAL ASSOCIATIONS:**The Web Resource Section 11. RESOURCES Recuperado el día 3 julio de 2013 de <http://mycorrhizas.info/resource.html>

**PEPINIERES BEAUCAMP** Recuperado el día 30 de Marzo de 2012 de <http://www.pepinieres-beaucamp.fr/Certification-de-l-arbre-truffier>

**SCIENCEDIRECT** Recuperado el día 18 de Enero de 2013 de <http://www.sciencedirect.com> telephora terrestres

**SYNDICAT NATIONAL DES PÉPINIÉRISTES PRODUISANT DES PLANTS À VOCATION TRUFFIÈRE** Recuperado el día 20 de Abril de 2012 de <http://www.pepinieristes-truffiers.com>

## **ANEJO: Descripción de los principales métodos**

En las siguientes páginas se exponen los cinco métodos de evaluación de planta micorrizada por *T. melanosporum* empleados en el presente trabajo, tal y como aparecen detallados en las publicaciones originales

- Reyna *et al.* (1997) CEAM-Valencia
- Chevalier *et al.* (1972) INRA-ANVAR
- Bencivenga *et al.* (1987) Universidad de Perugia
- Palazón *et al.* (1999) INIA-Aragón
- Fischer y Colinas (1996) Universidad de Lérida

## **1. Metodología CEAM-Valencia (España) Reyna et al. (1997)**

Es un método de evaluación basado en el número de micorrizas existentes por volumen de suelo (Reyna et al. 1997), La metodología consiste en el empleo de un sacabocados, con el que se obtiene una muestra del sistema radical de la parte central del cepellón. La muestra obtenida, tras un delicado lavado, se somete al recuento del número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*. El método establece una escala de calidad basada en el número de micorrizas por planta, con un mínimo admisible de 260 micorrizas de *T. melanosporum* por planta, para que ésta tenga una calidad mínima aceptable. El grado de contaminación con otras micorrizas no debe superar el 25% del número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*. Las contaminaciones con otras especies de *Tuber* suponen el rechazo del lote. El número de plantas muestreadas por lote es de 12, siempre que todas ellas presenten micorrizas de *T. melanosporum*, en caso contrario la muestra debe ampliarse a 35 plantas.

### **Análisis del grado de micorrización**

#### Muestreo volumétrico

Las muestras se extraen de 12 plantas escogidas aleatoriamente. El muestreo en volumen de los cepellones se realiza del siguiente modo: del cepellón de cada planta, cultivada en contenedor, se extrae con un sacabocados una muestra cilíndrica de 1,4 cm de diámetro en la zona media del contenedor y una longitud equivalente a la anchura del contenedor a esa altura, que varía con el tipo de contenedor. Esto supone un volumen muestreado del orden de 7 a 9 cc, equivalente, aproximadamente, a un 2% del volumen del contenedor. La muestra cilíndrica se extrae en sentido horizontal. Para ello se saca la planta del envase y se coloca en otro en el que se ha realizado ya una perforación a media altura, y se introduce el sacabocados imprimiendo una rotación constante para procurar el corte de las raíces y evitar su desgajamiento o rotura. Las muestras extraídas en la zona media del contenedor se consideran suficientes, ya que en ensayos previos no se obtuvieron diferencias significativas entre el estrato medio y el superior, ni entre el medio y el inferior, para una muestra de 10 plantas (Reyna, 1999).

Se procede a introducir la porción del cepellón en un envase de plástico y se pesa en el laboratorio con precisión de 0,1 gramos. Se incorporan unos 100 cc de agua a cada muestra junto a un detergente comercial. Las muestras se someten a un baño de ultrasonidos de 15 minutos. A las 24 horas se da un nuevo baño de ultrasonidos y se pasa el contenido del envase a un vaso de precipitados de 0,5 l. incorporando agua

hasta completar los 500 cc. Se realizan varias decantaciones sucesivas incorporando agua y descartando al cabo de 1 minuto. Con ello se logra la eliminación de arcillas, limos y parte de la materia orgánica. La manipulación se hace con el máximo cuidado para evitar la pérdida de de ápices radiculares.

El producto se recoge sobre un tamiz de 1 mm de luz y se vuelve a lavar por inmersión lenta en un vaso de precipitados. El producto decantado en el fondo del vaso se observa nuevamente con el fin de comprobar que no se han perdido ápices micorrizados; el producto del tamiz se observa a la lupa binocular, contándose todas las micorrizas, ápices sin micorrizar y micorrizas contaminantes.

Cuando se presentan dudas sobre el reconocimiento de alguna micorriza se comprueba al microscopio el manto en puzzle y la ornamentación de cistídios ramificados en ángulo recto, comprobándose que se trata de micorrizas de *T. melanosporum*.

Se contabilizan el número de micorrizas de *T. melanosporum*, ápices no micorrizados y contaminaciones con otras micorrizas.

Todas las referencias se calculan en volumen, la alternativa de referirlo a peso de la muestra daba mayores diferencias debido a la diferente humedad, huecos o falta de uniformidad del sustrato.

Si en la observación de muestras de sustrato se encuentra alguna sin micorrizas se comprueba en el sistema radical entero si existen o no micorrizas. No deben admitirse lotes que en la muestra de 12 plantas exista más de una planta sin micorrizar de *T. melanosporum*, lo que asegura, con un 95% de confianza, que el porcentaje de planta micorrizada está por encima del 77%. Para afinar con mayor seguridad este porcentaje, la muestra debería ampliarse al menos a 35 plantas siempre y cuando el porcentaje de no micorrizadas no supere el 10% de acuerdo con el programa estadístico C4-SPD 1.1 de cálculo de tamaño muestral.

En la siguiente tabla, podemos apreciar los diferentes criterios de calidad de este método según Reyna *et al.* (2000).

Tabla 17 Criterios básicos de calidad según Reyna et al. (2000)

## 5 Anexo

Tabla 1 Criterios básicos de calidad (según Reyna et al., 2000a)

Controles	Criterio de calidad
<i>Sobre los procesos de producción:</i>	
Material inoculante	Todos los carpóforos deben ser <i>Tuber melanosporum</i>
Condiciones de desinfección del cultivo	-
<i>Sobre la micorrización (con un nivel de confianza del 95%):</i>	
Grado de micorrización	El 95% de las plantas deben estar micorrizadas (tener más de 100 micorrizas de <i>Tuber melanosporum</i> )
Contaminación con otras especies de <i>Tuber</i>	Ausentes al menos en el 95% de las plantas
Contaminación admisible (resto de especies)	Deben representar menos del 20% del total de micorrizas de la planta, para el 95% de las mismas
Calidad de la micorrización	0-100 micorrizas/planta → planta no micorrizada 100-250 micorrizas/planta → micorrización escasa 250-500 micorrizas/planta → micorrización aceptable 500-1500 micorrizas/planta → micorrización buena 1500-3000 micorr./planta → micorriz. muy buena >3000 micorrizas/planta → micorriz. excelente

Tamaño de la muestra: 35 plantas/5000 individuos. Nivel de confianza del 95%



Fig.- 43 Extracción del plástico en el contenedor de 650 cc, antes de introducir el sacabocados.



Fig.- 44 Sobre la zona central del tipo contenedor del vivero 450 cc, se abre el contenedor y se extrae un volumen de tierra con el sacabocados.

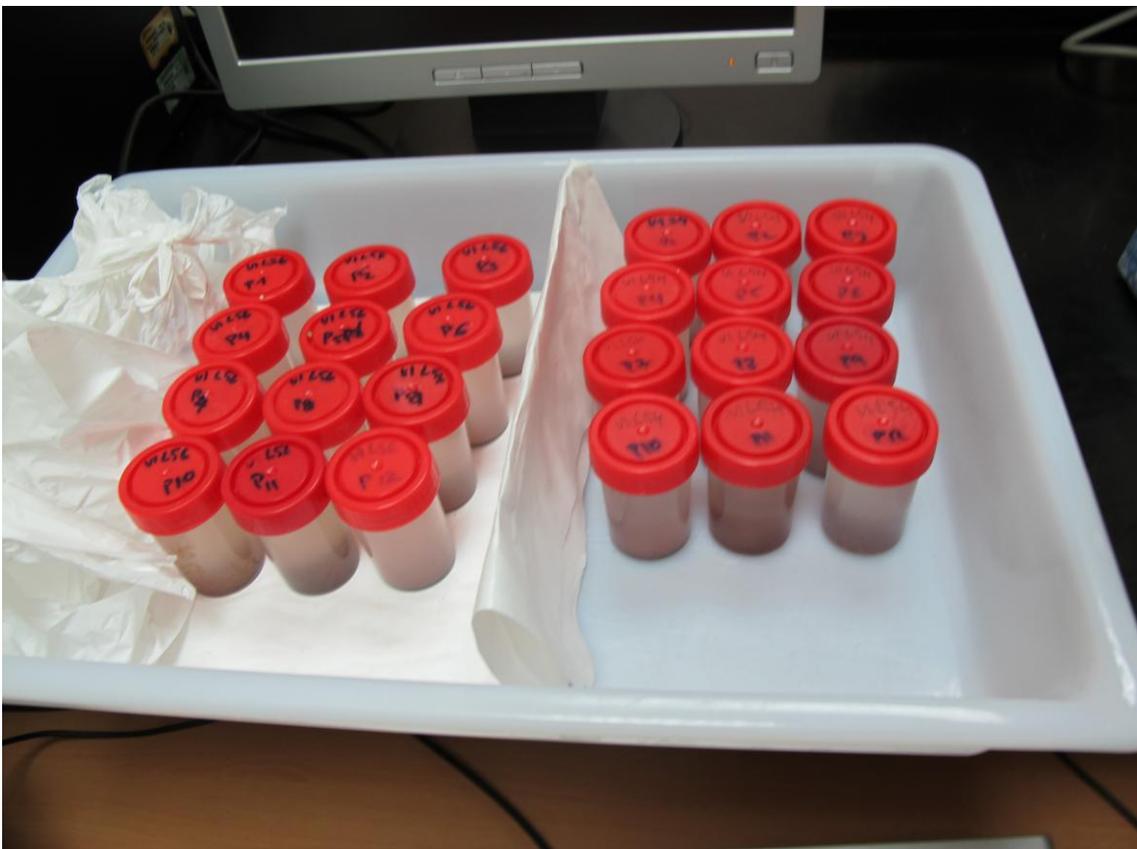


Fig.45 Muestras en botes con agua y tween 80 para conseguir separar al máximo raíces y sustrato.



Fig.- 46 Limpieza y separación de las raíces y el sustrato mediante un colador de 1 mm de luz.

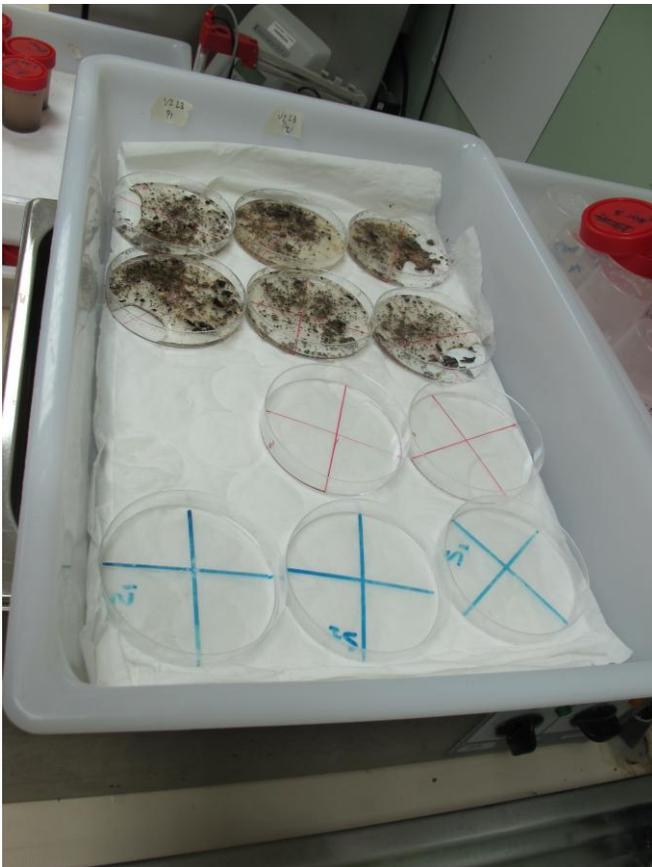


Fig.-47 Muestras listas para analizar bajo la lupa.

## 2. Metodología INRA-ANVAR (Francia) Chevalier *et al.* (1972)

Metodología desarrollada por el INRA francés, en colaboración con el INPL de Turín, para ser utilizada en exclusividad por la empresa Agri-Truffe en el etiquetado de su producción de planta micorrizada con *T. melanosporum*, aunque a partir de 1996 se incorporó a dicha exclusividad la empresa Robin.

El control de la micorrización se hace a final del otoño. Las plantas deben presentar las siguientes características:

Calidad forestal de acuerdo a normativa europea (Tabla 18).

Sistema radical suficientemente desarrollado y abundantemente ramificado.

Presencia de numerosas micorrizas de trufa uniformemente repartidas sobre todo el sistema radical.

El muestreo afecta al 1% de las plantas, siendo del 5% en aquellos lotes inferiores a 100 plantas. Al igual que otras metodologías posteriores, como la del CTIFL (Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes), se basa en el análisis del sistema radical de las plantas, asignando una nota a cada planta, de acuerdo con una escala de notación comprendida entre 0 y 5. La nota media de micorrización del lote corresponde a la media de las notas individuales de cada una de las plantas que componen la muestra, y debe ser igual o superior a 3 para que la etiqueta pueda ser expedida al lote. Ninguna planta del mismo puede presentar un porcentaje de micorrizas contaminantes superior al 10%.

**Tabla 18** Parámetros de Calidad forestal usados en Francia Fuente: Modificado de la pagina web: <http://www.pepinieristes-truffiers.com>

Edad planta (años)	1	1	2	2	2
	Altura minima	Diámetro mínimo	Altura minima.	Altura máxima	Diámetro mínimo
<i>Quercus pubescens</i>	12 cm	4 mm	12 cm	60 cm	4 mm
<i>Quercus ilex</i>	15 cm	4 mm	15 cm	60 cm	4 mm
<i>Quercus robur</i>	20 cm	6 mm	20 cm	60 cm	6 mm
<i>Corylus avellana</i>	20 cm	5 mm	20 cm	60 cm	5 mm

Valor estimado en una escala del 0-5 para evaluar cada planta. Realizado mediante la observación directa de su sistema radicular (Fig.- 48).

- 0 ninguna micorriza
- 1 plantas muy poco micorrizadas
- 2 pocas micorrizas
- 3 bastante micorrizadas
- 4 bien micorrizadas
- 5 muy bien micorrizadas

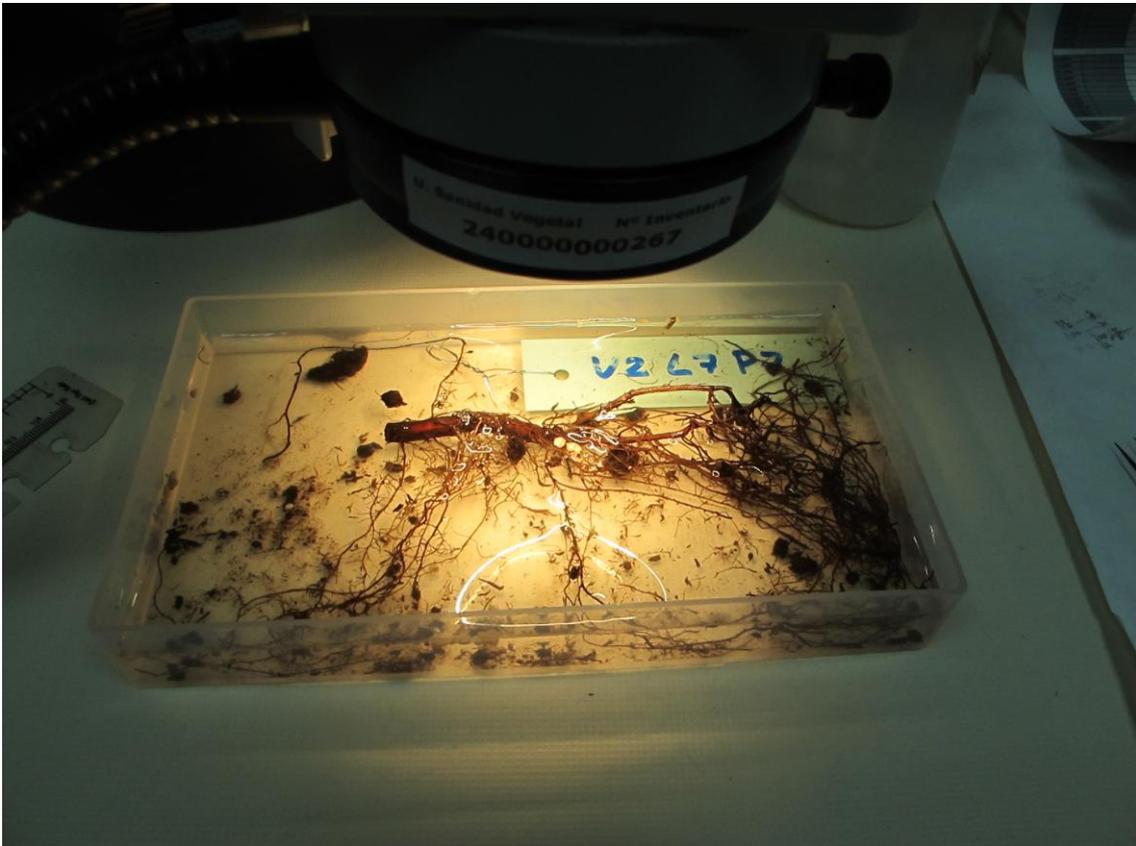


Fig.- 48 Sistema radicular limpio y sumergido en agua para su posterior observación con la lupa.

La diferencia entre cada grado no es uniforme y no se puede corresponder esta notación a un porcentaje (Giraud, 1988), aunque Trouvelot *et al.* (1986) realizó una tabla con valores estimatorios en tanto por ciento (Tabla 19).

Tabla 19 Sistema de evaluación y conversión a porcentaje de Trouvelot *et al.* (1986).

		% medio	Valores Chevalier
0 ninguna micorriza	0%	0	0
1 plantas muy poco micorrizadas	1 - 5%	3%	1
2 pocas micorrizas	6 - 25%	15%	2
3 bastantes micorrizas	26-50%	38%	3
4 bien micorrizadas	51-75%	63%	4
5 muy bien micorrizadas	76-100%	88%	5

Las plantas que tienen una nota de micorrización inferior a 3 son rechazadas. Si alguna planta del lote es portadora de micorrizas de *Tuber* no inoculadas serán rechazadas

La importación en fresco de trufas de origen asiático ha sido la causa de que esta certificación descrita deba ir acompañada de otra nueva etiqueta del Ministerio francés, implicado en la lucha contra el fraude comercial, en la que se explicita la ausencia de micorrizas del tipo descrito, particularmente *T. Indicum* y *T. himalayense*.

Para la evaluación del lote, se hallará el promedio de todas las notas individuales:

-Si el promedio es mayor que o igual a 2,5 se acepta el lote.

-Si el promedio es de menos de 2,5 se rechazara el lote.

### Control de lotes rechazados

Los lotes de un año rechazados con micorrización insuficiente se puede mantener en vivero y realizar un control al año siguiente.

Los lotes de dos años o contaminados se destruyen en presencia del agente del CTILF.

El CTIFL emite etiquetas numeradas para lotes conformes (Fig.- 49) y el viverista deberá incorporar a cada planta del lote conforme la etiqueta previa a la venta.

Al final de la temporada, un agente de Ctifl hace una visita al vivero para comprobar que los lotes rechazados no han sido vendidos y garantizar que los lotes aceptados se vendieron.

El INRA, Controla la micorrización sobre una muestra estadísticamente representativa dentro de la norma ISO 9001.



Fig.- 49 Ejemplo de etiqueta expedida por el INRA.

### **3. Metodología Universidad de Perugia (Italia) Bencivenga *et al.* (1995)**

Desarrollada por varios centros de investigación italianos, esta metodología se basa en el conteo de ápices micorrizados en distintos sectores del aparato radical de las plantas, aconsejando muestrear el 1% de las plantas de cada lote, del que se extraen al menos 4 raíces por sector y planta, examinando 50 ápices por cada fragmento de raíz.

En el caso de que las plantas presenten una micorrización heterogénea, con gran variabilidad entre las mismas, se aconseja muestrear el 3-5% de los lotes. No se hace referencia en este método a exclusiones o rechazo del lote por la aparición de micorrizas contaminantes, siempre que se mantenga un diferencial de 20 puntos porcentuales entre las micorrizas de *Tuber* y las contaminantes.

El método se realiza en tres fases:

1. Individualizar la micorriza del género *Tuber* y su identificación a nivel de especie.
2. Evaluar el grado de micorrización de cada planta de la muestra del lote.
3. Evaluar el grado de micorrización del lote de plantas.

#### **1. Identificación de la micorriza**

La presencia y la identificación de las micorrizas se constatan con las siguientes operaciones:

- a. Se extrae la planta del contenedor y se lava delicadamente su sistema radicular procurando de reducir al mínimo la pérdida de ápices micorrizados.
- b. Se examina a la lupa todo su sistema radicular con el fin de individualizar y localizar la presencia de micorrizas del género *Tuber* y de otras formas diferenciables por caracteres morfológicos y biométricos.
- c. Se efectúa entonces el análisis microscópico de las diversas formas de micorrizas encontradas para proceder a la identificación de las especies presentes.

#### **2. Evaluación del grado de micorrización de una planta**

Constatada la presencia de las micorrizas del tipo de trufa buscado se procede sobre cada planta de la muestra a la evaluación cuali-cuantitativa.

a. Se individualiza el sistema radicular, considerándolo desde el cuello de la planta hasta su extremidad radical, dos sectores de igual longitud: uno próximo y el otro distal, sin considerar la eventual presencia de raíces largas y aisladas (Fig.-50).

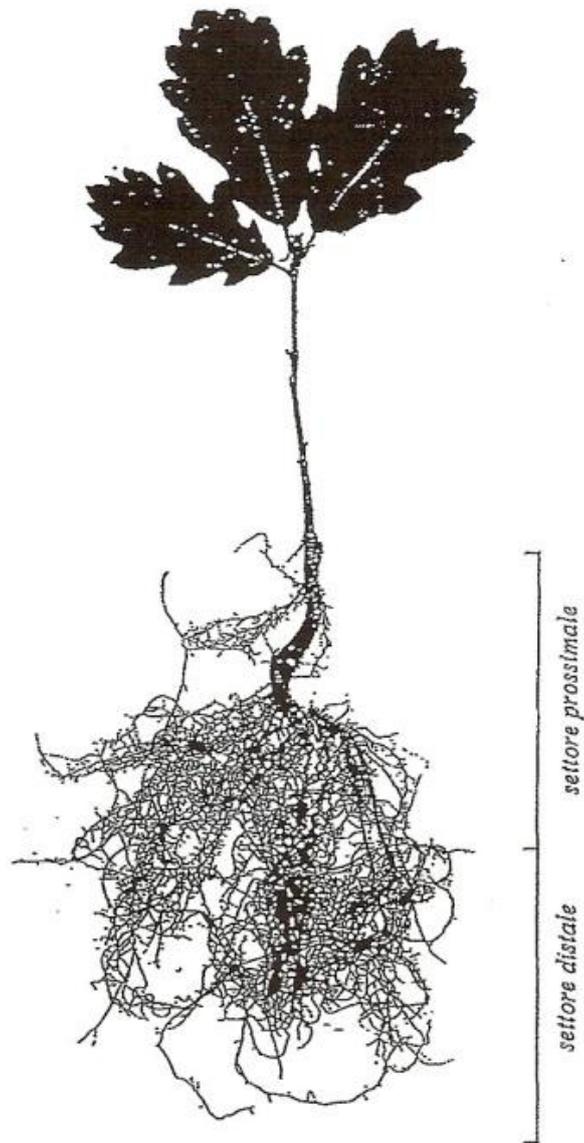
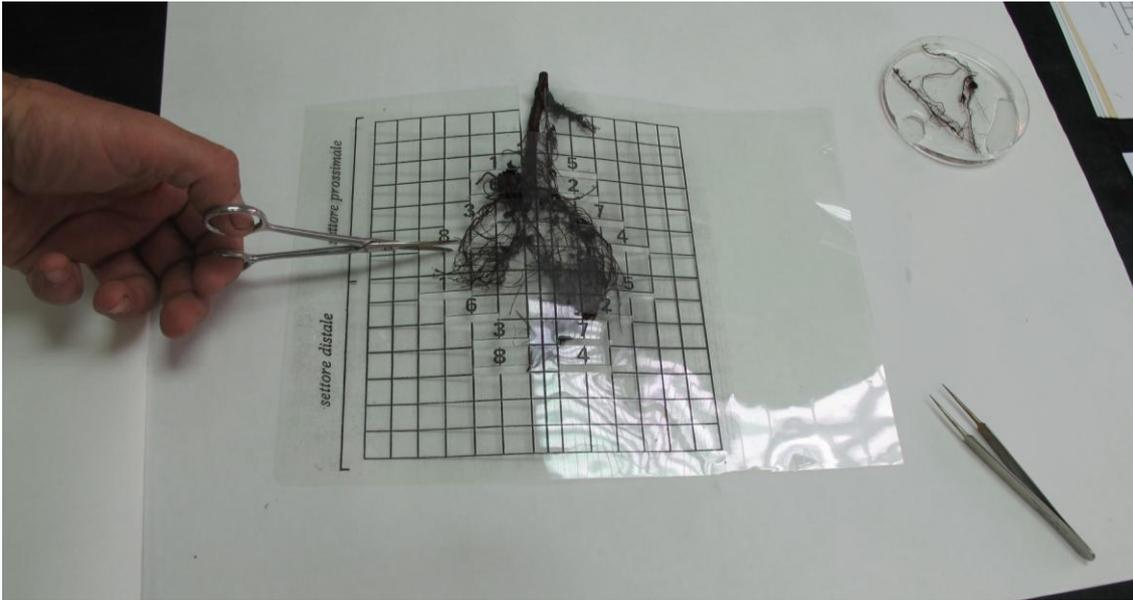


Fig.-50 El sistema radicular de la planta se divide en dos partes iguales, como se aprecia en el dibujo.

b. Se tomaran, de puntos diferentes y distantes entre ellos, al menos 4 porciones de raíces de la mitad próxima del sistema radicular y 4 porciones de la mitad distal (Fig.-51).



**Fig.-51** Planta preparada y situada bajo una plantilla, desde la cual extraemos porción de raíz para su posterior observación

**c.** A partir de la parte próxima al cuello de cada porción de raíces, se cuentan sin ninguna exclusión, los primeros 50 ápices radiculares en cada fragmento, separándolos en:

    Ápices micorrizados de la especie de trufa buscada.

    Ápices micorrizados de otra especie fúngica.

    Ápices no micorrizados.

**d.** Se calculan, para cada sector y para la planta entera, el porcentaje de los ápices micorrizados de la especie de trufa buscada, de los ápices micorrizados de otras especies fúngicas y de aquellos no micorrizados, referidos al total de ápices contados.

Los datos analíticos se apuntan en la tabla 20.

**Nota 1**

Los resultados de la elaboración estadística de los datos relativos a los porcentajes de ápices micorrizados de los sistemas radiculares de 5 muestras de plantas para cada una de las diez especies simbiotas utilizadas en truficultura (*Quercus pubescens*, *Q. robur*, *Q. cerris*, *Q. ilex*, *Corylus avellana*, *Ostrya carpinifolia*, *Tilia cordata*, *Populus alba*, *Salix caprea*, *Pinus pinea* ) han revelado que (Bencivenga *et al.* 1995):

1) *Los porcentajes de ápices micorrizados descubiertos separadamente de la parte próxima y la distal del sistema radicular no están suficientemente correlacionados entre ellos.*

2) Existe una correlación positiva muy estrecha entre el porcentaje de micorrizas encontradas en los primeros 50 ápices y aquellos encontrados en los primeros 100 ápices radicales contenidos en cada raíz muestreada.

3) Existe una evidente disformidad entre los porcentajes de micorrizas encontrados en las diversas raíces de una misma planta micorrizada; la disformidad es tanto más elevada cuando más bajo es el grado de micorrización de la planta.

4) Del punto de vista estadístico, en presencia de una fuerte heterogeneidad de los porcentajes de micorrización, al fin de contener el error de evaluación dentro del límite del 5% con el 95% de probabilidad, se necesitaría analizar al menos la mitad de los ápices radicales de la planta.

A razón de estas observaciones ha sido decidido someter a análisis sólo los primeros 50 ápices. En atención al número de las porciones de raíces sometidas a control, para reducir el costo de los análisis y hacer el método más rápido, se ha tenido oportuno de tomar 8 fragmentos de raíces (4 en la parte próxima y 4 en la distal). Los análisis de estos fragmentos nos aprovisionan de datos próximos a la realidad en las plantas con una buena micorrización. Cuando se revelan porcentajes de micorrización muy diferentes en los fragmentos de raíces del mismo sector, se sugiere al analista de aumentar el número de los fragmentos hasta 12-16 para reducir dentro de límites aceptables los errores de evaluación.

## **2.a. Criterio para la definición de la validez de una planta micorrizada**

Una planta, puede ser considerada válida para truficultura, si presenta todos estos requisitos:

**a.** Porcentaje de ápices micorrizados de hongos diferentes a la trufa inoculada no superior a 15%.

**b.** Porcentaje de ápices micorrizados de hongos diferentes a la trufa inoculada no superior a 15%.

**c.** Diferencia entre el porcentaje de los ápices micorrizados de la trufa inoculada y porcentaje de ápices micorrizados de otros hongos igual o superior a 20%.

d. Características bio-morfológicas de estado vegetativo, desarrollo del sistema aéreo y radical y sanidad según normas de la CEE para la producción viverística forestal.

### **3 Evaluación del grado de micorrización de un lote de plantas**

La evaluación se efectúa sobre un lote homogéneo de plantas.

Un lote homogéneo puede definirse cuando es constituido con plantas de la misma especie y edad, obtenidas con iguales métodos de propagación, inoculadas con el mismo método, en un intervalo de tiempo no superior a 10 días, con la misma especie de *Tuber*, y cultivada (con la misma técnica) en el mismo ambiente de cultivo.

Una mayor homogeneidad podrá ser obtenida eliminando, del lote, las eventuales plantas con el sistema aéreo dañado de parásitos o que presentan desarrollo deforme respecto al resto o que no se pueden considerar válidas según el perfil viverístico.

#### **3.a. Modalidad de muestreo**

En lotes homogéneos, constituidos por más de 1000 plantas, el muestreo debe ser efectuado tomando al menos el 1% de las plantas; en lotes de dimensiones inferiores el muestreo deberá ser obligatoriamente compuesto de al menos 10 ejemplares. Las plantas que constituyan la muestra de análisis van a ser elegidas por el analista o por medio de una plantilla de números aleatorios.

Las plantas a muestrear, en espera del análisis, deberán almacenarse correctamente para conservarlas en su total integridad.

#### **Nota 2.**

Las plantas de un lote no tienen el mismo grado de micorrización y a menudo el porcentaje de ápices micorrizados de trufa varía entre límites muy amplios.

El análisis estadístico, ejecutado en lotes constituidos de plantas con porcentajes de micorrización muy diferentes entre ellos, ha evidenciado que para contener el error de evaluación del porcentaje medio del lote dentro del 5% independientemente de las dimensiones del lote, es necesario analizar al menos 80 plantas, en el caso de lotes con micorrización homogénea, tales valores medio puede ser obtenido analizando solo 6 plantas (Bencivenga *et al.* 1995). Por tales motivos se aconseja, en vía preliminar de controlar el 1% de la planta sugiriendo al analista de aumentar hasta el 3-5 % en el caso en que la planta del primer muestreo presente micorrización muy heterogénea al fin de contener el error de evaluación dentro de límites aceptables.

### **3 b. Periodo de la toma y análisis de las muestras**

La toma de las muestras y los análisis de micorrización deberán ser efectuados, preferentemente en otoño, época en que son visibles las hifas peritróficas, las espínulas y los cistidios que describen la caracterización morfológica de la micorriza de *Tuber* a nivel de especie.

### **3 c. Criterios para la definición de la validez de un lote de plantas**

En base a la experiencia en el examen de numerosas muestras homogéneas de plantas tomadas de partidas experimentales y comerciales y una consideración de orden biológico se ha convenido establecer válido para el fin de la truficultura, un lote homogéneo cuando al menos el 80% de las plantas de la muestra resultan idóneas según los requisitos de acuerdo al punto 2a, habiendo establecido que ninguna planta de la muestra deberá ser carente de micorrizas de la trufa inoculada.

Si en el análisis, el lote no resulta válido, la plantas que lo forman pueden ser cultivadas un segundo año. Si en el segundo año el lote sigue siendo no valido, toda la plantas que lo forman no podrán ser certificada como idóneas para truficultura.

Los datos analíticos se apuntan en la tabla 21.

### **3 d. Periodo de validez del análisis del lote**

Dado que el control conviene efectuarlo en otoño, la distribución de la planta deberá hacerse poco después, en el curso del invierno, o como máximo, en la primavera sucesiva. Con la permanencia de la planta en vivero el estado de micorrización podría modificarse en sentido negativo a causa de contaminaciones de micelios externos. En el caso de que la distribución no se avenga en los tiempos indicados, se deberá ejecutar un nuevo control del lote.

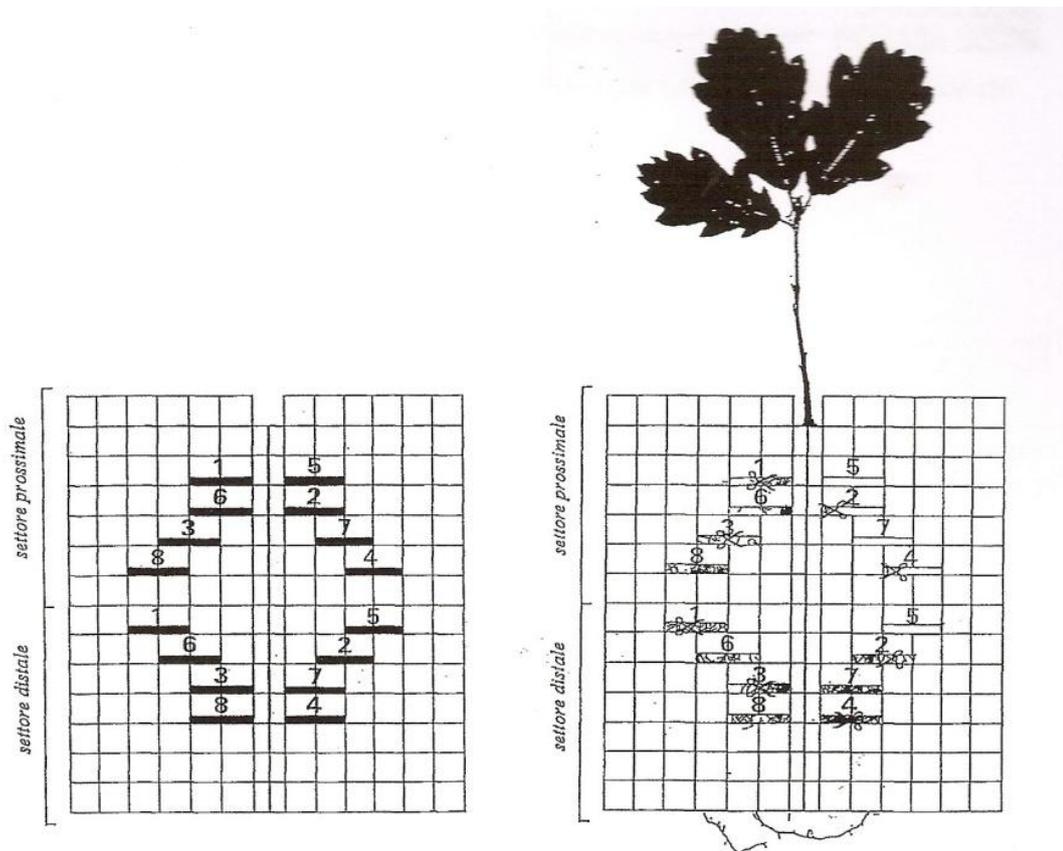


Fig.- 52 Modelo a utilizar para la elección de las raíces sometidas a análisis. La medida de la plantilla es de 13 cuadrados de 1 cm de lado x 14 cuadrados de 1 cm de lado.

En la figura 52 se expone la plantilla necesaria para extraer fragmentos de raíces y realizar el conteo. En la banda coloreada en negro irán abiertas unas ranuras (2 cm x 0,3 cm). Se aconseja de realizar esta plantilla con un folio plastificado no transparente de modo de no condicione la elección de micorrizas mientras se muestra.

Una vez lavado el sistema radicular de la planta, se extiende sobre un papel secante y con cuidado se superpone la plantilla. En cada uno de los dos sectores del aparato radicular se insertan unas tijeras por las ranuras 1, 2, 3 y 4, cortando las raicillas más próximas al punto central de la ranura. La raíz cortada se extrae con unas pinzas sin mover la plantilla.

En el caso que, en un sector, en los puntos indicados 1, 2, 3 y 4 no hubiera raíces se puede proceder a recoger de los puntos 5, 6, 7 y 8 en el mismo sector. También en el caso de querer ampliar la muestra se pueden recoger raíces en los puntos 5, 6, 7, y 8.

**TABLA DE EVALUACIÓN DE UNA PLANTA (Tabla 20)**

Fecha \_\_\_\_\_ Planta N° \_\_\_\_\_ Lote N° \_\_\_\_\_

N° plantas del lote \_\_\_\_\_ nº de plantas de la muestra \_\_\_\_\_

Especie de planta huésped \_\_\_\_\_

Especie de trufa inoculada \_\_\_\_\_

Método de reproducción:     semillas     esqueje     micropropagada

Método de inoculación:                     espora     fragmento de carpoforo      
aproximación radicular

Fecha de reproducción \_\_\_\_\_ Fecha de la inoculación  
\_\_\_\_\_

**Evaluación forestal**

Altura \_\_\_\_\_

Diametro del tallo en la base \_\_\_\_\_

Longitud del aparato radicular \_\_\_\_\_

Observaciones \_\_\_\_\_

Sector próximo	Micorrizas de la		Micorrizas de		Ápices sin	
	nº	%	nº	%	nº	%
1º						
2º						
3º						
4º						
5º						
Media						
Sector distal						
1º						
2º						
3º						
4º						
5º						
Media						
Media de la						

El analista \_\_\_\_\_

**TABLA DE EVALUACIÓN DE UN LOTE DE PLANTAS MICORRIZADAS CON TRUFA (Tabla 21)**

Lote N° \_\_\_\_\_ Fecha de evaluación \_\_\_\_\_

N° plantas del lote \_\_\_\_\_ N° de plantas analizadas \_\_\_\_\_

Especies hospedadoras \_\_\_\_\_

Especies de trufa inoculada \_\_\_\_\_

Método de reproducción:    o semillas    o esqueje    o micropropagación

Método de inoculación:                    o espora                    o fragmento de carpóforo                    o  
aproximación radicular

Fecha de reproducción \_\_\_\_\_ Fecha de la inoculación \_\_\_\_\_

Evaluación viverística \_\_\_\_\_

Planta    Altura del tronco            Longitud de la raíz            Diámetro del tronco en la base

Planta N°	Altura del tronco (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Diámetro del tronco en la base (cm)	Micorrizas de la trufa inoculada %	Micorrizas de otros hongos %	Ápices sin Micorrizas %
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
Media						

Juicio conclusivo \_\_\_\_\_

El analista \_\_\_\_\_

#### **4. Metodología INIA – Aragón (España) Palazón *et al.* (1999)**

En primer lugar se limpian las plantas, abriendo los contenedores y desprendiéndose con sumo cuidado la tierra menos adherida. Las plantas se introdujeron en jarras de plástico de 2,5 litros de capacidad llenas de agua, y se dejaron en remojo aproximadamente 5 minutos. Trascurrido este tiempo se aclaran y se introducen en piscinas rectangulares de medidas 18x10x5.5 cm que contienen agua, procediendo posteriormente a su observación con lupa binocular para comprobar el grado de limpieza del sistema radicular. Si todavía existe suciedad adherida a las raíces se da un baño de ultrasonidos de aproximadamente 10 minutos. En el momento en que las raíces estén limpias, se procede a la toma de muestras y a la identificación morfológica de las micorrizas.

##### **1.- Toma de las muestras**

Se divide el sistema radical en tres partes longitudinalmente iguales con ayuda de una regla. Cada una de estas partes se denominan S1 (sector superior radical), S2 (sector medio), S3 (sector inferior). De cada uno de los sectores en que se queda dividida la raíz se seleccionan al azar con unas pinzas una cantidad de raicillas suficientes que alberguen al menos unos 100 ápices. Esta muestra se analizaba morfológicamente (Fig.-53).



Fig.-53 Primera observación de la planta y toma de muestras de los 3 sectores en que se ha dividido la planta.

## 2.- Conteo

Las raicillas seleccionadas de cada uno de los sectores se observan en primer lugar a la lupa binocular. La primera medida sirve para diferenciar una serie de características de las micorrizas, como su pilosidad, color, tipo de ramificación, presencia y color de sus rizomorfos, etc. lo cual permite asignar a cada tipo de micorrizas un porcentaje sobre el total de ápices micorrizados.

La observación al microscopio es la más importante, ya que es la única que permite identificar cada tipo micorrícico.

Posteriormente, se procede al conteo de 300 ápices, repartidos cuantitativamente en los tres sectores de la raíz, calculando la media de ápices micorrizados y la media de los no micorrizados con *Tuber*, como se aprecia en la figura 54.

La evaluación positiva por planta se basa en alcanzar un mínimo del 30% de micorrizas de *T. melanosporum* y en que el porcentaje máximo de ápices contaminados no puede superar el 30%.

La validez de un lote de plantas micorrizadas se da cuando la media del porcentaje de micorrización es mayor o igual al 20%, excluyendo este sino cumple la normativa de

calidad forestal al 95% o existe presencia de otra *Tuber* que no se haya inoculado. Los datos evaluativos tomados por planta son reflejados en la tabla 22.

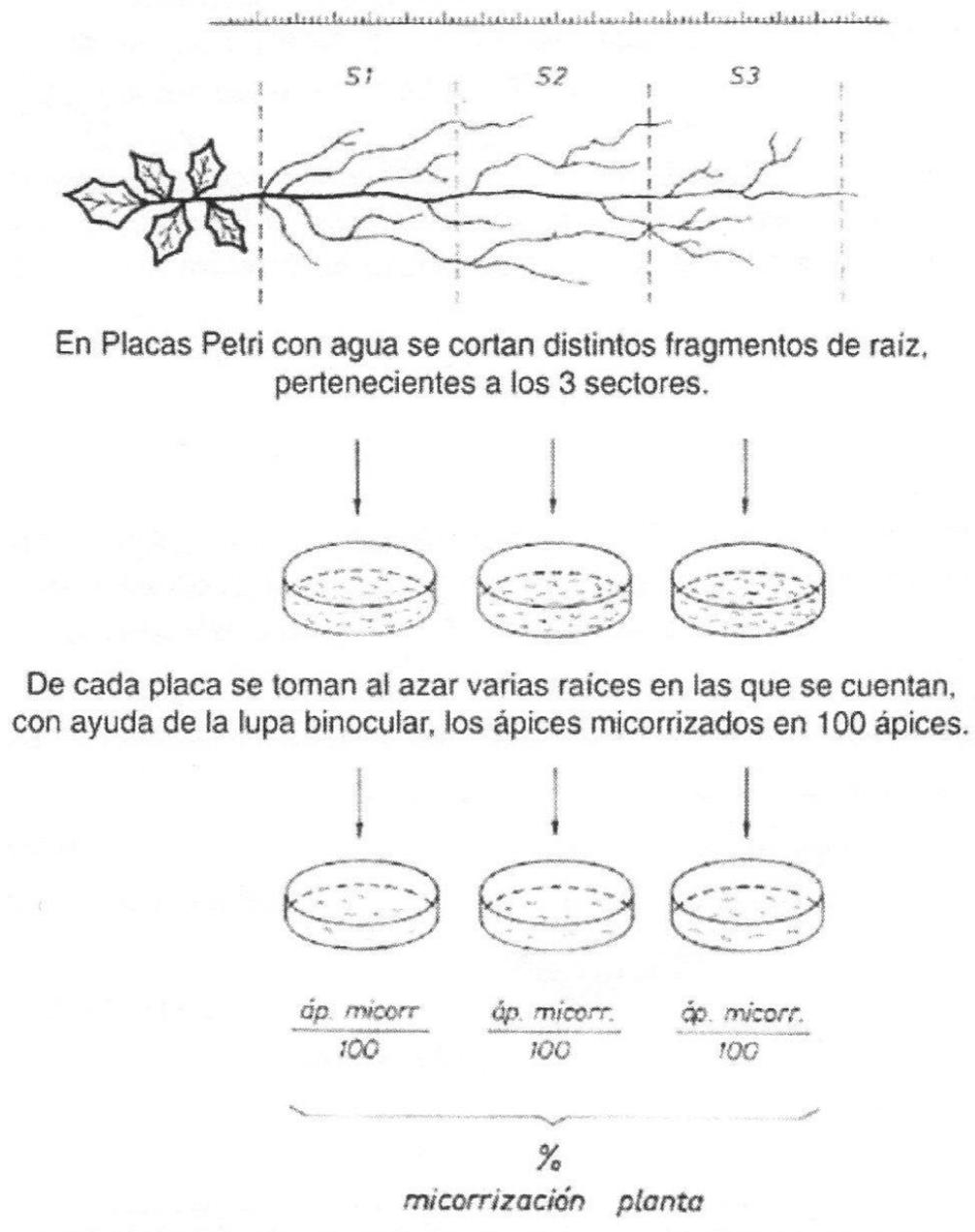


Fig.- 54 Esquema de trabajo para la realización del cálculo del porcentaje de micorrización.

## TABLA DE EVALUACIÓN DE UN LOTE DE PLANTAS

Tabla 22 Modelo de estadillo para la evaluación de planta micorrizada por *Tuber melanosporum* Vittad.

Lote N<sup>o</sup> \_\_\_\_\_ Fecha evaluación \_\_\_\_\_

Material vegetal \_\_\_\_\_ Procedencia \_\_\_\_\_

N<sup>o</sup> de plantas del lote \_\_\_\_\_ N<sup>o</sup> de plantas analizadas \_\_\_\_\_

Estado fenológico  1 savia  2 savias

Criterios de calidad según normativa CEE  cumple  no cumple

	Primera observación			Nº ápices T. melanosporum/100				Contaminantes					
	Raíces tróficas abundantes	Colonización >10%	Contaminación <50%	S1	S2	S3	media	1	2	3	4	5	6
Planta 1													
Planta 2													
Planta 3													
Planta 4													
Planta 5													
Planta 6													
Planta 7													
Planta 8													
Planta 9													
Planta 10													
Observaciones:													

VALORACION FINAL	ADMITIDO	RECHAZADO	PDTE. NUEVA VALORACIÓN

## 5. Metodología Universidad de Lérida (España) Fischer y Colinas (1996)

Se analizan 12 plantas por lote, cortando el sistema radical en segmentos de 2-3 mm, que se colocan sobre una bandeja con cuadrículas, anotando la proporción de micorrizas de *T. melanosporum* (PT) y la de contaminantes (PC) en un mínimo de 250 ápices radicales. La novedad del método estriba en la importancia de las proporciones respecto a los porcentajes, que deben alcanzar un mínimo para que no se rechace el lote. La presencia de cualquier micorriza de *Tuber* distinta de *T. melanosporum* supone igualmente la exclusión del lote.

### 1. Identificación del lote

Documentación de homogeneidad y garantía fitosanitaria (estándares nacionales) requiere que todas las plantas presenten en común las siguientes condiciones:

- Procedencia de la semilla
- Fuente y método de inoculación
- Fecha de inoculación
- Sustrato
- Condiciones de vivero

### 2. Toma de muestras

De cada lote se seleccionarán 12 plantas. Este número está basado en la variabilidad entre lotes (Fischer y Colinas, 1996).

Selección desarrollada por el agente de control de forma aleatoria para evitar cualquier tipo de desviación y satisfacer los requerimientos de los métodos estadísticos utilizados.

Las plantas deben ser transportadas al laboratorio de certificación, refrigeradas y almacenarse a 4°C hasta que sean examinadas, preferiblemente en un plazo de 2 semanas desde la toma de muestras en vivero.

#### Procedimiento de lavado

Las plantas deben ser cuidadosamente extraídas del contenedor con el cepellón completo y sumergidas en un baño de agua para empapar el sustrato. Después, se procederá a eliminar el sustrato de las raíces de las plantas, una por una, en una bandeja de agua con agitaciones suaves para no romper los ápices cambiando el

agua frecuentemente y sin aplicar la presión directa de un chorro de agua. Los restos de sustrato que quedan adheridos a las raíces se pueden eliminar con pinzas finas bajo el microscopio estereoscópico.

### **3. Evaluación de calidad de planta**

Antes de evaluar los niveles de micorrización es necesario verificar que las plantas cumplen los criterios de calidad (Apéndice 1). Las plantas que no cumplen estos niveles estándar de calidad no serán evaluadas en el meticuloso proceso de conteo de ápices. Los estándares de la Unión Europea establecen que al menos un 95% de plantas de un lote superen los controles de calidad de planta (Peñuelas, 1993). El analista documentará los resultados de calidad de su evaluación en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2).

#### Primera observación al microscopio estereoscópico

El segundo paso en el examen es una primera observación de todo el sistema radical de la planta al microscopio estereoscópico, observando la abundancia de raíces tróficas, el estado micorrizado, la presencia, desarrollo y apariencia general de las micorrizas de *T. melanosporum*, y la presencia de contaminantes. En esta etapa el analista tiene que examinar al microscopio óptico los ápices cuyo estado micorrizado sea incierto para facilitar que el conteo posterior. Si se encuentran ápices micorrizados con una especie de Tuber distinta de *T. melanosporum* el lote deberá ser rechazado.

En esta fase se han de cumplir otros tres criterios:

- a) Un mínimo de 250 raíces tróficas.
- b) Porcentaje de micorrización con *T. melanosporum* no claramente inferior al 10%.
- c) Porcentaje de micorrizas contaminantes no claramente superior al 50%.

El analista documentará los resultados de esta evaluación en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2).

#### Conteo de ápices

En las plantas que hayan superado las dos primeras evaluaciones se medirán las proporciones de *T. melanosporum* (PT) y de contaminantes (PC). El procedimiento es el siguiente:

- 1) Eliminar el tallo y cortar el sistema radicular de la planta en dos o en cuatro partes iguales en sentido longitudinal, eligiendo aleatoriamente una parte para su análisis.

- 2) Cortar cuidadosamente el sistema radical en segmentos de 2-3 mm y situarlos sobre una cuadrícula de 1 cm x 1 cm, de una plantilla que posee diferentes colores, y ésta, sumergida en una bandeja de análisis con agua (Fig.- 55).
- 3) Distribuir los segmentos homogéneamente por toda la superficie de la bandeja evitando romper ápices y comenzar el conteo utilizando cuadrículas elegidas aleatoriamente del mismo color.
- 4) En cada cuadrícula elegida se clasificarán todas las raíces tróficas en las siguientes categorías: No micorrizadas (N), micorrizadas con *T. melanosporum* (T), micorrizadas con micorrizas contaminantes (C). Los ápices senescentes se considerarán no micorrizados.
- 5) Continuar el conteo hasta haber observado 250 ápices.

El analista documentará los resultados de esta evaluación en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2).

#### Determinación de las proporciones de cada planta

Después de haber examinado 250 ápices se calcularán las siguientes proporciones:

Proporción de *T. melanosporum* (PT)=  $T/(N+C)$

Proporción de contaminantes (PC)=  $C/T$

T: número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*

N: número de ápices no micorrizados

C: número de ápices micorrizados con contaminantes

El analista debe introducir los datos de la planta en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2).

#### Determinación de intervalos de confianza de PT y de PC de un lote (Apéndice 3).

Después de hacer los cálculos de PT y PC para las primeras 5 plantas, el analista determinará los intervalos de confianza al 95% para los valores de PT y PC del lote. Si los criterios son cumplidos, el lote puede ser certificado sin continuar el muestreo. Si no es así, el analista debe de continuar el análisis hasta que se cumpla el criterio de aceptación o se alcance la decimosegunda planta. Si el lote no cumple los criterios, no podrá ser certificado.

#### Criterio de idoneidad para la truficultura

El lote será admitido cuando se cumplan los siguientes criterios:

- a. No debe haber ninguna planta que no haya cumplido los criterios de calidad. Si una planta no cumple los criterios de calidad, se puede continuar con la evaluación con una muestra más amplia hasta 90 plantas para confirmar la calidad del lote.

- b. El límite inferior del intervalo de confianza del número de raíces tróficas del lote debe ser mayor de 1800.
- c. No debe haber ninguna planta que tenga un PT menor de 0.11 (10%).
- d. No debe haber ninguna planta que tenga una PC mayor de 1.0 (50%).
- e. El límite inferior del intervalo de confianza de PC debe ser mayor de 0.50 (33% colonizado por *T. melanosporum*).
- f. El límite superior del intervalo de confianza de PC debe ser menor de 0.33 (el nivel de contaminantes en raíces tróficas debe ser inferior al 25%).
- g. No debe haber ninguna planta con micorrizas de una especie de Tuber distinta de *T. melanosporum*.
- h. Si un lote no cumple los criterios e, f y g, el lote no podrá ser admitido.

Si un lote cumple los criterios de e, f, y g, pero 1 o 2 plantas no cumplen los criterios a, b, c, o d, el lote puede someterse a una segunda evaluación con una muestra mayor. Si un lote cumple los criterios de e, f y g, pero 3 o más plantas no cumplen los criterios a, b, c o d, el lote no podrá ser admitido.

### **Segunda evaluación de calidad de planta**

Cuando encontramos una planta inadmisibles en una muestra de tan sólo 12 plantas, no podemos garantizar que el lote tenga menos del 5% de plantas en esas condiciones. Por ello necesitamos una muestra de 90 plantas (Steel y Torrie, 1980). Esta segunda evaluación sólo deberá abordarse si PT y PC estimados a partir de la primera muestra son lo suficientemente buenos como para pensar que el lote podría ser admitido.

El proceso para la segunda evaluación es similar al primero en el sentido de que cada planta tiene que cumplir los criterios de calidad de planta y la primera observación al microscopio estereoscópico.

No es necesario el conteo de ápices de raíz si las plantas cumplen estas dos etapas.

El intervalo de confianza dependerá del número de plantas analizadas y del número de plantas rechazadas hasta el momento y se puede hallar en las tablas de intervalos de confianza binomiales con un límite superior del 5% de las plantas rechazadas (Steel y Torrie, 1980). El analista podría obtener intervalos de confianza cada 5 ó 10 plantas después de la planta número 23, que es la primera en que la amplitud del intervalo de confianza puede ser menor que el límite. De esta manera será posible aceptar o rechazar un lote sin necesidad de evaluar la muestra de 90 plantas por completo.

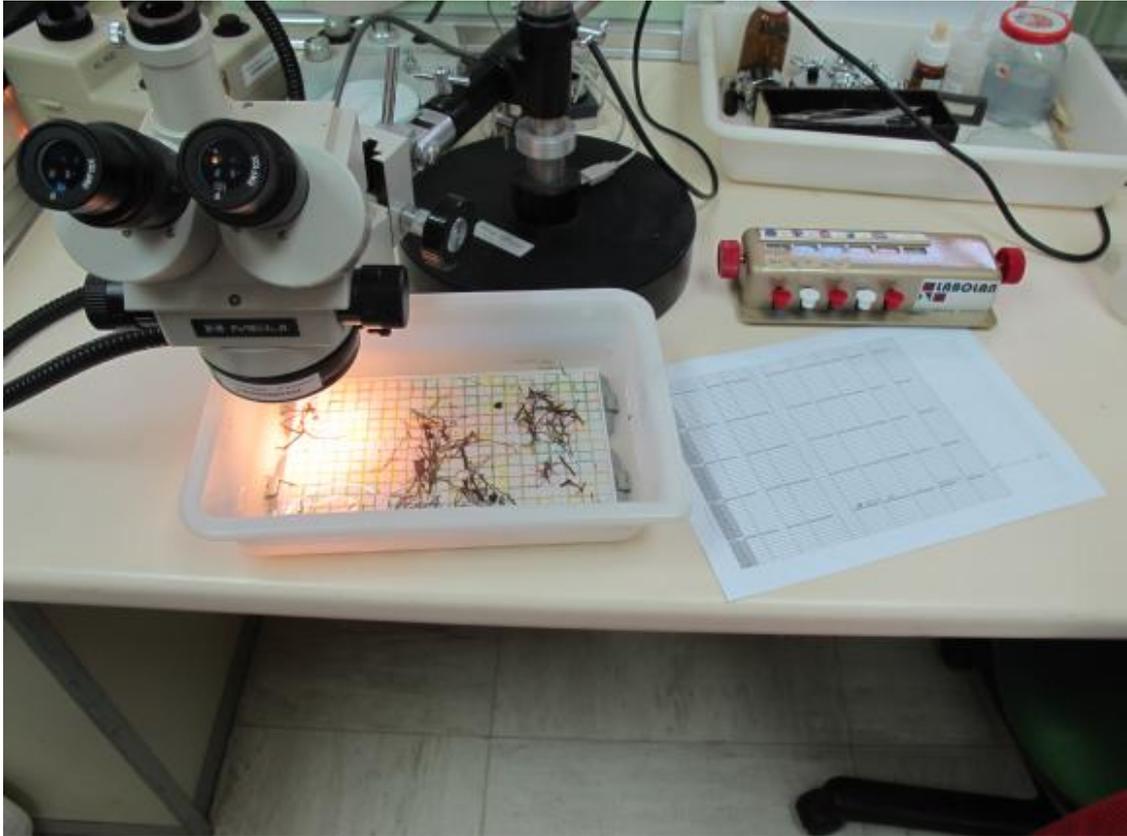


Fig.- 55 Planta preparada para poder ser analizada sobre un plantilla requerida por este método.

#### **Apéndice 1: Criterio de evaluación de calidad de planta para *Quercus ilex* en contenedor**

Según el anexo VII, parte E del Real Decreto 289/2003 sobre comercialización de los materiales forestales de reproducción. Las plantas no se comercializarán si el 95% de cada lote no es de calidad cabal y comercial. No se considerarán de calidad cabal y comercial las plantas que presenten algunos de los siguientes defectos:

1. Heridas distintas de las causadas por la poda o heridas debidas a los daños de arranque.
2. Ausencia de yemas susceptibles de producir un brote apical.
3. Tallos múltiples.
4. Sistema radicular deformado.
5. Signos de desecación, recalentamiento, enmohecimiento, podredumbre o daños causados por organismos nocivos.

6. Desequilibrio entre la parte aérea y la parte radical. Una planta que cumple los mínimos de altura y diámetro de cuello debe tener un mínimo de 900 raíces tróficas.
7. Dimensiones por edad: Plantas de 1 año con altura mínima de 8 cm, altura máxima de 30 cm y un diámetro del cuello mínimo de 2mm: Plantas de 2 años con altura mínima de 15 cm, altura máxima de 50 cm y el diámetro del cuello mínimo de 3 mm.

Apéndice 2: Determinación de intervalos de confianza de PT y de PC de un lote.

Lote:	Vivero:	Fecha:	DISTR.T.INV(0,05;CONTAR(F37:F12)-1)*ECUAD(VAR(F37:F12)/CONTAR(F37:F12))														
Planta	Calidad planta	1º Observ.	PT	PC	log(PT)	log(PC+0.1)	Amp I.C. (log(PT))	Amp. I.C. (log(PC+0.1))	lim inf I.C. (log(PT))	lim sup I.C. (log(PT))	lim inf I.C. (log(PC+0.1))	lim sup I.C. (log(PC+0.1))	mediana PT	mediana PC	media %tuber	media %contam	lim inf PC
1			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
8			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
9			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
10			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12			#####	#####	#DIV/0!	#DIV/0!	#NUM!	#NUM!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

					Intervalos de confianza		medianas	resultado	
					lim. infer.	lim. sup.			
					PT	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
					PC	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
					TotTubs	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
					% Tuber	#N/A	#N/A	#N/A	
					% Contam.	#N/A	#N/A	#N/A	
Número de micorizas de <i>T. melanosporum</i> /planta					Num Mic Tube	#N/A	#N/A	#N/A	

Apéndice 2: Hoja de datos de Planta.

Evaluación de plantas de <i>Q. ilex</i> inoculadas con <i>T. melanosporum</i>									
Planta N°:	V1L58P12	Vivero:		Fecha de siembra:					
Fecha:		Lote:		Fecha de inoculación:					
<b>Calidad de planta</b>									
Heridas	Yemas apicales	Tallos múltiples	Deform Rad	Sanidad	Equilibrio	Dimensiones	Altura talk	Diam cuello	Long. Cep
1	1	1	1	1	1	1			
<b>Primera Observación</b>					Comentario PLANTA APTA				
Min. 900 raíces tróficas	Colonización Tuber >10%	Contaminantes < 50%	sp. otros tuber	sp. otros hongos					
1	1	1	0	0	Comentario				
<b>Conteo raíces tróficas</b>		Porc. Sist. Rac	1						
Cuadro	<i>T. mel.</i>	No Mic.	Contamin.	Total					
1				0					
2				0					
3				0					
4				0					
5				0					
6				0					
7				0					
8				0					
9				0					
10				0					
11				0					
12				0					
13				0					
14				0					
15				0					
16				0					
17				0					
18				0					
19				0					
20				0					
21				0					
22				0					
23				0					
24				0					
25				0					
26				0					
27				0					
28				0					
29				0					
30				0					
31				0					
32				0					
33				0					
34				0					
35				0					
<b>Sumas:</b>	<b>T=0</b>	<b>N=0</b>	<b>C=0</b>	<b>0</b>					
<b>TOTAL = 0</b>	<b>PT = T/N+C =</b>		<b>#DIV/0!</b>						
	<b>PC = C/T =</b>		<b>#DIV/0!</b>						