LA CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA MICORRIZADA CON TRUFA NEGRA

Palazón C. (1), **Urdíroz A.** (1), **Barriuso J.** (2), **Delgado I.** (1)
(1) Servicio de Investigación Agroalimentaria. Gobierno de Aragón.
(2) Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza.

RESUMEN
La certificación de la planta micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) carece de una normativa oficial que garantice el establecimiento de la simbiosis del hongo, en proporciones adecuadas para su cultivo. El trabajo recoje los antecedentes suscitados para la elaboración de una norma o protocolo de certificación únicos, por parte de todos los sectores implicados en este tipo de actividad, a la vez que detalla el protocolo asumido por el Instituto de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) y que fue enviado para su consideración al Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (INSSPPV).

ANTECEDENTES
La producción de planta micorrizada con trufa negra por parte de los viveros especializados en este tipo de actividad, carece en la actualidad de una normativa oficial de referencia que permita garantizar que las plantas objeto de la venta presentan raices micorrizadas de *Tuber melanosporum* Vitt. en una cantidad razonable y suficiente para justificar su precio.

El Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) auspició varias reuniones técnicas entre todos los sectores implicados, intentando unificar criterios y elaborar un protocolo para la certificación de la planta. A pesar de que no se llegó a un acuerdo entre los diferentes asistentes, el INIA, basándose en las diferentes propuestas y métodos presentados, elaboró su propio protocolo, remitiéndolo al Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero (INSSPPV) para su consideración.

En el momento actual, transcurridos 5 años desde el hecho anterior, la situación no ha cambiado demasiado. El traspaso de competencias por parte del INSSPPV a las Comunidades Autónomas y la existencia de Instituciones o Entidades locales que están implicadas en la concesión de ayudas y subvenciones a la plantación de frondosas micorrizadas, ha acentuado la pluralidad de etiquetas que garantizan la calidad de las plantas, apoyadas en diferentes protocolos técnicos que no han sido contrastados suficientemente entre sí.

En la última Reunión del Grupo Europeo Tuber (GET), celebrada en Graus (Huesca), se ha instado a los diferentes países integrantes a elaborar un protocolo de certificación europeo único, protocolo GET, que sirva de referencia y permita contrastarlo con los utilizados en la actualidad por los controladores actuales.

NORMATIVA PROPUESTA POR INIA

CRITERIOS GENERALES

Cualquier metodología implicada en la certificación de planta micorrizada con *T. melanosporum* debería cumplir los siguientes requisitos:

- debe ser sencilla y de fácil aplicación
- debe ser económicamente viable
- el concepto de contaminación debe estar bien definido
- debe ser sometida a revisiones periódicas

METODOLOGÍA

A) Control de la facies esporal

Se proporcionará a los Viveros material para que recojan, en tubos de ensayo, muestras de las suspensiones de esporas que han utilizado para inocular los lotes. Cada tubo se identificará anotando la especie vegetal, número de lote y fecha de inoculación.

Terminada la inoculación de cada lote, se depositarán las muestras en el Centro de Certificación Oficial, donde se observarán al microscopio las ascosporas del inóculo esporal y la presencia de posibles contaminantes.

B) Identificación del lote homogéneo

Se considerará un lote homogéneo cuando todas las plantas del mismo tengan idénticos:

- procedencia de la bellota.
- fecha de siembra.
- substrato de cultivo.
- lote de inóculo.
- proceso, método y fecha de inoculación.
- régimen de riego.

C) Toma de muestras

La calidad comercial de las plantas será el primer factor a considerar, por lo que las partidas estarán formadas, como mínimo, por un 95% de plantas que cumplan los criterios necesarios (PEÑUELAS, 1995) para este fin. Esto es muy importante pues las plantas que no los cumplan, pueden excluirse del conteo de ápices micorrizados que se realizará posteriormente.

Es algo evidente que el tamaño de la muestra representa el aspecto más importante sobre el que se va a basar cualquier análisis estadístico. En nuestro caso este tamaño está condicionado por el alto precio de las plantas y por la laboriosidad del análisis que se realiza sobre las mismas y que siempre es destructivo. Estos hechos han influenciado la elección de un porcentaje de muestreo, o tamaño de muestra, que se ha cifrado en un 5 p.1000 como mínimo, aunque se recomienda que, en los primeros años de certificación se empiece con un 8 p.1000.

El número de plantas a muestrear por lote, no será nunca inferior a 8, independiente del tamaño del lote.

La toma de muestra de las plantas se hará siempre de forma aleatoria.

D) Lavado de las plantas

Las plantas se colocarán agrupadas, sumergidas con sus contenedores, en un recipiente con agua durante 24 horas, para que se disgreguen las partículas del substrato con el menor perjuicio para la raíz. Si es necesario, puede añadirse al agua una pequeña cantidad de Twin 80.

Posteriormente, se lavarán individualmente bajo el grifo, con mucho cuidado pues si el substrato está muy adherido a la raíz de la planta, podemos perder gran parte de ápices micorrizados al intentar lavarla. Es un hecho comprobado que el tipo de substrato utilizado, puede provocar una gran adherencia del mismo a las raíces, dificultando su análisis.

E) Primera observación a la lupa

Una vez lavada la planta, se sumerge horizontalmente en un recipiente con agua. El recipientepuede ser transparente o de algún color en la base, que contraste con la coloración de la raíz, si ello facilita la observación (Foto 1).

Los detalles a considerar en esta primera observación son los siguientes:

- presencia o ausencia de micorrizas
- cantidad de las mismas
- lugar de concentración (en el cuello de la raíz, sector medio o sector apical) o distribución homogénea.
- identificación de los diferentes tipos de micorrizas, si los hay, al microscopio.

Un problema que puede plantearse es el grado de maduración de las micorrizas, ya que si éstas son inmaduras, o incluso muy senescentes, pueden plantear problemas de identificación, lo que obliga a la realización de numerosas preparaciones microscópicas.

Otro problema que afecta a la calidad de la planta es el de la ausencia o escasez de raíces tróficas, que puede conducir a valores poco fiables del porcentaje de micorrización, hecho que el observador debe tener muy en cuenta y consecuentemente rechazar esa planta de la muestra.

Las micorrizas de *T. melanosporum* Vitt. son claras y se identifican con facilidad, pero hay contaminantes y otros tipos de micorrizas que no están bien definidos. Por ello son necesarias claves claras y prácticas que faciliten el diagnóstico. En este sentido hay que proclamar la urgencia en la elaboración de un catálogo de contaminantes, que facilite el intercambio de información ayudando a identificar las micorrizas no deseadas, en la certificación *de T. melanosporum.*

F) Conteo de las micorrizas

Inmediatamente después de realizar la primera observación procedemos a sacar la planta de su recipiente, colocándola sobre la mesa, próxima a una regla o plantilla que nos permita dividir el aparato radicular de la planta en tres sectores (S1=superior, S2=medio y S3=apical), aproximadamente de la misma longitud (Foto 2).

De cada una de las 3 divisiones extraemos totalmente al azar un número suficiente de raíces que nos permitan contar un mínimo de 100 ápices radicales (Foto 3).

Al final se obtienen, pues, 3 porcentajes, de los que se calcula la media aritmética, que corresponde al porcentaje de micorrización (PM) de la planta analizada.Todos los datos obtenidos desde la recepción del lote serán recogidos en un estadillo evaluación (Fig. 1) que facilite el control de los mismos.

G) Requisitos mínimos exigibles

Este es uno de los aspectos de mayor responsabilidad y que ha suscitado mayores discusiones en su elaboración, pues se trata de fijar unas condiciones mínimas, a sabiendas de que en algunos casos pueden resultar insuficientes y en otros excesivas. Esto puede explicarse claramente si tenemos en cuenta que la planta micorrizada, va a transplantarse en un terreno definitivo, lleno de competidores biológicos y en el que su proporción de ápices micorrizados por *T. melanosporum* sólo es un factor más, dentro de la complejidad del ecosistema en el que se va a desarrollar, para decidir en qué sentido se va a desarrollar dicha simbiosis. Un porcentaje de micorrización (PM) del 20 p.100, es realmente escaso, aunque puede ser suficiente si el terreno definitivo cumple una serie de características, que hagan la competencia hacia *T. melanosporum* muy difícil. En el caso contrario podríamos tener plantas con un 40 p.100 de micorrización, cuya simbiosis va a sufrir una recesión importante debida al exceso de organismos y especies competidoras, pudiendo incluso desaparecer con el paso del tiempo. Es pues evidente que las características de la planta micorrizada son muy importantes, aunque no se debe perder de vista la importancia de otros factores como el suelo, su textura, su química, su microbiología, la climatología, y las prácticas culturales, que condicionarán el éxito de una plantación trufera.

Las condiciones fijadas para la certificación de un lote han sido las siguientes:

- el porcentaje mínimo de ápices micorrizados con *T. melanosporum* debe ser ≥30% (PM ≥30).
- la presencia de cualquier otro *Tuber*, distinto a *T. melanosporum* implicará el rechazo inmediato del lote.
- el porcentaje máximo de ápices contaminados, no debe superar el 30 p.100.

Los requisitos descritos parecen bastante abiertos y accesibles para aquellos productores de planta micorrizada con un mínimo de preparación y con la tecnología precisa.

BIBLIOGRAFÍA

PEÑUELAS J., 1995. Calidad de la planta forestal: normativa y control. Jornadas sobre nuevas técnicas de producción de planta forestal. Junta de Castilla y León. Molinos de Duero, Soria. 7-10 de octubre 1995.

MAPA, INIA., 1997. Reunión sobre certificación en España del control de calidad de planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. Zaragoza, 12 de junio de 1997.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), fondos FEDER , en el Marco del Programa Sectorial de I+D Agrario y Alimentario del MAPA, Proyecto SC00-013.

FIGURA 1. MODELO DE ESTADILLO PARA LA EVALUACIÓN DE PLANTA MICORRIZADA POR *Tuber melanosporum* Vitt. (Palazón y Cartié)

Lote Nº..... Fecha de la evaluación .....
Material vegetal..... Procedencia .....
Nº de plantas del lote..... Nº 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:

VALORACIÓN FINAL	ADMITIDO	RECHAZADO	PDTE. NUEVA VALORACIÓN

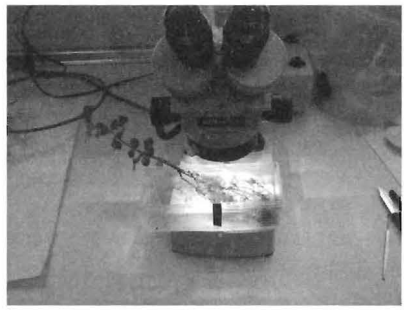


Foto 1. La planta se introduce en un contenedor con agua, para su observación

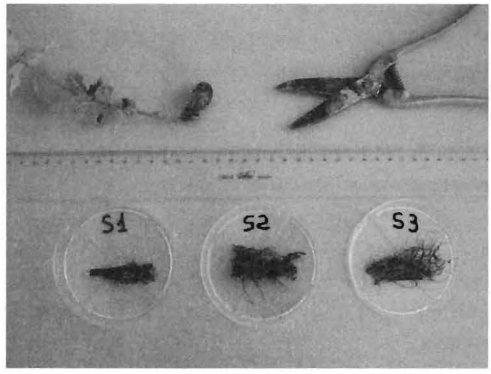


Foto 2. La raíz se corta en 3 partes iguales, depositando su contenido en placas de Petri

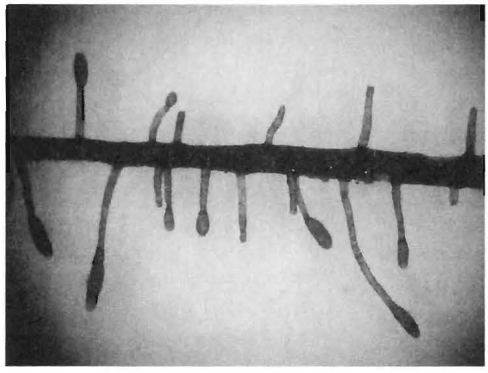


Foto 3. Aspecto que presentan las raíces durante su conteo. Pueden observarse ápices micorrizados contigüos a otros que no lo están.