

**Puesta a punto de un método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum***

*Informe para el Centro de Investigación Forestal de Valonsadero, Soria.*

Christine Fischer y Carlos Colinas  
Universitat de Lleida  
1996

## Indice

1ª fase: Bibliografía.....	2
2ª fase: Descripción de las micorrizas de <i>Tuber melanosporum</i> .....	8
Caracteres macroscópicos .....	8
Caracteres microscópicos .....	8
2a fase: Descripción de las micorrizas de <i>Tuber melanosporum</i> .....	9
Diapositivas: 1-16 .....	9
3ª fase: Descripción de las micorrizas de <i>Tuber brumale</i> .....	11
Caracteres macroscópicos .....	11
Caracteres microscópicos .....	11
Diapositivas: 1-19 .....	12
3ª fase: Metodología y resultados de la síntesis de micorrizas entre <i>Quercus ilex</i> y 3 especies de hongos del género <i>Tuber</i> . 14	
Estratificación de los carpóforos de <i>Tuber</i> .....	14
Estratificación y germinación de las bellotas .....	14
Preparación de sustratos y plantación de las bellotas germinadas.....	15
Preparación de la suspensión de esporas e inoculación de las plantas .....	16
Cultivo en el invernadero durante 3-7 meses .....	16
Examen de los sistemas radiculares .....	16
Resultados.....	17
Discusión .....	17
4ª fase: Clave sinóptica para la identificación de <i>Tuber</i> <i>melanosporum</i> y otras ectomicorrizas de encina en vivero.....	19
Bibliografía.....	22
4ª fase: Método de muestreo de raíces de plantas de <i>Quercus ilex</i> para estimar su nivel de colonización con <i>Tuber</i> <i>melanosporum</i> y con otras micorrizas contaminantes .....	23
Introducción: .....	23
Material y métodos .....	24
Recolección de datos.....	24
Métodos estadísticos.....	24

Comparación proximal / distal.....	26
Mínimo número de muestras .....	26
Resultados.....	27
Comparación proximal / distal.....	27
Mínimo número de muestras .....	28
Discusión .....	30
Bibliografía.....	32
5ª fase: Determinación del número de plantas que deben ser examinadas en el control de un lote de plantas de <i>Quercus</i> <i>ilex</i> inoculadas con <i>Tuber melanosporum</i> .....	33
Introducción: .....	33
Métodos y Resultados .....	33
Cálculo del número mínimo de plantas necesario para estimar PT y PC.....	33
Primera estimación .....	35
Validación de la estimación.....	37
Cálculo del número mínimo de plantas necesario para estimar la calidad de planta del lote. ....	38
Discusión .....	40
Bibliografía.....	41
5ª fase: Informe del viaje al Institut für Systematische Botanik der Universität München, Section Mykologie. Menzingerstr. 67, D-80638 Munich.....	42
Lavado .....	42
Preparación de ápices para el microscopio.....	42
Discusiones sobre <i>Tuber</i> .....	43
5ª fase: Método de control de planta de <i>Quercus ilex</i> inoculada con <i>Tuber melanosporum</i> .....	45
Introducción: .....	45
Procedimiento de control.....	45
Identificación del lote .....	45
Toma de muestras.....	46
Procedimiento de lavado .....	47
Evaluación de calidad de planta .....	47

Primera observación al microscopio estereoscópico .....	47
Conteo de ápices .....	48
Determinación de las proporciones de cada planta .....	50
Determinación de intervalos de confianza de PT y de PC de un lote.....	50
Criterio de control .....	51
Segunda evaluación de calidad de planta.....	52
Identificación del lote .....	52
Toma de muestras.....	53
Evaluación de calidad de planta.....	53
Primera observación al microscopio estereoscópico .....	53
Determinación del I.C. del número de plantas que no cumplen los criterios de calidad de planta o de la primera observación	53
Criterio de control .....	54
Discusión .....	54
Documentación.....	54
Calidad de planta .....	54
La primera observación .....	56
El conteo de ápices.....	56
Confidencialidad.....	56
Criterios de control.....	57
Bibliografía.....	59
Apéndices.....	60

### **1ª fase: Bibliografía**

- Agerer, R 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In "Methods in Microbiology, Volume 23, Techniques for the Study of Mycorrhiza". Norris, J.R.; Read, D.J.; Varma, A.K. (Eds.). Academic Press, Inc.; San Diego, CA
- Agerer, R. (ed.). 1987-95. Colour Atlas of Ectomycorrhizae, 1st-9th delivery. Einhorn-Verlag, Schwabisch Gmund.
- Agresti, Alan 1990. Categorical Data Analysis. John Wiley & Sons; New York
- Bencivenga M. 1982. Alcune metodiche di micorrizazione di piante forestali con il tartufo nero pregiato di norcia o di spoletto (*Tuber melanosporum* Vitt.). L'informatore Agrario, 38: 1-5.
- Bencivenga M.; Pacioni G. 1978. Casi di micorrizia con *Tuber melanosporum* Vitt. Micologia Italiana, 45:29-32.
- Bencivenga, M., Di Massimo, G., Donnini, D. y M. Tanfulli. 1995. Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene: Nota 1-Inquinanti in vivaio. Mic. Ital. 2: 167-178.
- Bencivenga, M., Donnini, D., Tanfulli, M., and Guiducci, M. 1995. Tecnica di campionamento delle radici e degli radicali per valutazione delle piante micorrizate. Mic. Ital., 2: 35-47.
- Bencivenga, M., Ferrara, A.M., Fontana, A., Granetti, B., Gregorio, G., Lo Bue, G., Palenzona, M., Rebaudengo, E., Tocci, A. y A. Zambonelli. 1987. Valutazione dello stato di micorrizazione in piantine tartufigene. Min. Agr. For.
- Boutekrabort A., Pargney J.C. 1991. Etude ultrastructurale de *Tuber melanosporum* Vitt. en culture isolee et en association avec des vitroplants de *Quercus* (*Q. robur* et *Q. pubescens*). Cryptogamie, 12: 25-45.
- Boutekrabort A.; Chevalier G. 1990. Mycorrhization par *Tuber melanosporum* Vitt. de vitroplants de *Quercus robur* L. et *Quercus pubescens* Willd. Agronomie, 10:127-132.
- Branzanti M.B.; Zambonelli A. 1984. Sintesi micorrizica del *Tuber albidum* con *Pinus pinea*. Micologia Italiana, 2 : 51-53.
- Cameleyre I.; Oliver J.M. 1993. Evidence for intraspecific isozymes variations among French isolates of *Tuber melanosporum* (Vitt.). FEMS Microbiology Letters, 110: 159-162.
- Chevalier, G. 1973. Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber brumale* Vitt. a partir de cultures pures du champignon. Ann. Phytopathol. 5 (2): 163-182.
- Chevalier, G. 1973. Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber brumale* Vitt. à partir de cultures pures du champignon. Ann. Phytopathol. 5 (2): 163-182.
- Chevalier, G. 1974. Convergence des caractères du peridium des ascocarpes et du manteau des mycorhizes chez quelques espèces de *Tuber*. Ann. Phitopatholog., 6 : 492-492.
- Chevalier, G. 1978. L'espèce *Tuber aestivum* Vitt.: II. Ecologie. Mushroom Science, 10: 977-993.

## Fase 1. Bibliografía

- Chevalier, G. 1984. Production of plants inoculated with truffle fungi and grown using the "Melfert" technique. *Agronomie*, 4(2): 211.
- Chevalier, G. 1985. La mycorrhization controlle en pepiniere forestiere, possibilites d'aplication aux conteneurs. *Revue Forestiere Francaise* 37(2): 93-106.
- Chevalier, G. 1985. Mycorrhizal synthesis of *Tuber* spp. with *Corylus avellana* et *Quercus pubescens* in a nutritive mist box. *Agronomie*, 5(6).
- Chevalier, G. y Grente, J. 1978. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production a grande echelle de plants mycorrhizes par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Science*, 10: 483-505.
- Chevalier, G.; Cougol, C.; Demkiw, J. 1983. La mycorrhization des resineux. Comptes rendus de l'Action initiative. Publication Station de Pathologie Vegetale de Clermont-Ferrand, 41p.
- Chevalier, G.; Desmas, C. 1975. Synthèse axénique des mycorrhizes de *Tuber melanosporum*, *T. uncinatum* et *T. rufum* sur *Pinus silvestris* a partir de cultures pures du champignon. *Ann. Phitopatholog.*, 15: 0338-0338.
- Chevalier, G.; Desmas, C. 1977. Mycorrhization par *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en milieu fortement fertilisé. *Annales de Phytopathologie*, 9(1): 93-96.
- Chevalier, G.; Giraud, M.; Bardet, M.Ch. 1982. Interactions between mycorrhizae formed by *Tuber melanosporum* and by other ectomycorrhizal fungi in soils favourable to truffle fungi. In, Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & Trouvelot, A. (eds.). *Mycorrhizae, an integral part of plants: biology and perspectives for their use*. Ed. INRA Publ. Colloq. INRA 13:313-321.
- Chevalier, G.; Grente, J. 1973. Mycorrhizal spreading by truffle from scised roots and mycorrhizated seedlings. *Annales de Phytopathologie*, 5(3): 317-318.
- Chevalier, G.; Grente, J. 1973. Obtention de mycorrhizes de différents *Tuber* par synthèse a partir de spores en conditions gnotoxéniques et a partir de cultures pures de mycelium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Ann. Phitopatholog.*, 12: 107-108.
- Chevalier, G.; Mousain, D. 1975. Associations ectomycorrhiziennes entre des Tuberacées et des Cistacées. *Societe Francaise de Phitopathologie*, 21: 355-356.
- Chu-Chou, M.; Grace, L. J. 1984. *Endogone flamicorona* and *Tuber* sp. as micorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 22: 525-531.
- Danielson, R.M. 1984. Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerosporella brunnea* (Pezizales). *Mycologia* 76 (3): 456-461.
- Delmas J.; Chevalier G. 1981. Etude de la mycorrhization par *Tuber melanosporum* en fonction des caracteristiques physico-chimiques et mecaniques. *Inra-ctifl*, 12: 1-7.
- Delmas J.; Chevalier G. 1982. Mécaniques des sols et mycorrhizes de *Tuber melanosporum*. *Les Colloques De L'inra*, 13: 329-335.

## Fase 1. Bibliografía

- Delmas J.; Poitou N. 1973. Contribution a la connaissance de l'ecologie de *Tuber melanosporum*: la truffe du périgord. Academie D'agriculture De France, 27: 1486-1494.
- Delmas J.; Poitou N. 1978. La mycorhization de *Quercus pubescens* par *Tuber melanosporum* en conditions controlées: influence de quelques facteurs du milieu. Mushroom Science, 10: 995-1105.
- Devore, Jay; Peck, Roxy 1986. Statistics: The Exploration and Analysis of Data. West Publishing Company; St. Paul
- Dobson, Annette J. 1990. An Introduction to Generalized Linear Models. Chapman and Hall; New York, NY
- Dupre, C.; Chevalier, G.; Palenzona, M.; Biocca, E. 1993. Characterization of the mycorrhizas of several *Tuber* species using enzymatic polymorphism. Cryptogamie Mycologie, 14: 163-170.
- Fasolo-Bonfante P.; Fontana A. 1971. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum* i dimostrazioni di un effecto fitotossico. Allionia, 17: 47-54.
- Fasolo-Bonfante P.; Fontana A. 1973. Sulla nutrizione del micelio di *Tuber melanosporum* Vitt. in coltura. Instituto Botanico Dell'universita Di Torino, 37: 731-741.
- Filipello Marchisio V. 1980. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum* Vitt. i la flora streptomycetica di terreni tartufiferi dell'italia centrale. Allionia, 38: 133-137.
- Fontana, A. 1971. Il micelio di *Tuber melanosporum* Vitt. in coltura pura. Allionia 17:19-23.
- Fontana, A., Ceruti, A., and Meotto, F. 1989. Criteri istologici per riconoscimento delle micorrize di *Tuber magnatum* Pico. In, Bencivenga, M., & Granetti, B. (eds.). Proc. Atti del II Congresso Internazionale sul Tartufo. Spoleto, Italy, November, 1988. pp. 141-154.
- Fontana, A.; Giovanetti, G. 1979. Simbiosi micorrizica tra *Cistus incanus* L. ssp. *incanus* e *Tuber melanosporum* Vitt. Allionia 23:5-11.
- Fonvieille, J.L.; Touze-Soulet, J.M.; Kulifaj, M.; Montant, C.; Dargent, R. 1990. Composition of ascospore and ascospore wall of *Tuber melanosporum*. C.R. Acad. Sci. Paris t. 310, Série III: 557-563.
- Giovanetti, G.; Fontana, A. 1982. Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaeae. New Phytol., 92: 533-537.
- Gregori, G.L., and Ciappelloni, R. 1989. L'impiego di inoculo derivante da carpofori precoci di *Tuber magnatum* Pico per la micorrizzazione di piantine forestali. In, Bencivenga, M., & Granetti, B. (eds.). Proc. Atti del II Congresso Internazionale sul Tartufo. Spoleto, Italy, November, 1988. pp. 191-196.
- Grente J., Chevalier G., Pollacsek A. 1972. La germination de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la syntèse sporale des mycorrhizes. Academie de Sciences de Paris, 20: 743-746.

## Fase 1. Bibliografía

- Hu, H. 1992. *Tuber formosanum* sp. nov. and its mycorrhizal associations. *Quartely Journal Expt. Forest. Ntu*, 6: 79-87.
- Ingleby, K; Mason, PA; Last, FT; Fleming, LV 1990. Identification of Ectomycorrhizas. HMSO Publications, London.
- Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Harper Collins Publishers, Inc. New York, NY, EE.UU.
- Le Tacon, F.; Delmas, J. 1982. Influence du régime hydrique du sol et de la fertilisation sur la fructification de la truffe noire du périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.) dans le sud-est de la france. *Acta Oecologica*, 3: 291-306.
- Little, Thomas M.; Hills, F. Jackson 1978. *Agricultural Experimentation Design and Analysis*. John Wiley & Sons, Inc.; New York
- Luppi Mosca A.M.; Fontana A. 1977. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. IV. Analisi micologiche di terreni tartufigeri dell'italia centrale. *Allionia*, 22: 105-113.
- Mamoun, M. y J.M. Olivier. 1993. Competition between *Tuber melanosporum* and other ectomycorrhizal fungi under two irrigation regimes. 1. Competition with *Tuber brumale*. *Plant and Soil* 149: 211-218.
- Mamoun, M.; Olivier, J.M. 1991. Influence du substrat carboné et de la forme d'azote minéral sur la croissance de *Tuber melanosporum* Vitt. en culture pure. Application á la production de biomasse mycélienne. *Agronomie*, 11: 521-527.
- Mamoun, M.; Olivier, J.M. 1992. Effect of soil pseudomonads on colonization of hazel roots by the ecto-mycorrhizal species *Tuber melanosporum* and its competitors. *Plant and Soil*, 139: 265-273.
- Meotto, F. y P. Carraturo. 1987-88. Ectomicorrizia di *Sphaerosporella brunnea* (A.&S.) Svrcek & Kubicka in piantine tartufigene. *Allionia* 28:109-116.
- Mischiati, P.; Fontana, A. 1993. In vitro culture of *Tuber magnatum* mycelium isolated from mycorrhizas. *Mycol. Res.* 97 (1): 40-44.
- Montacchini F.; Fasolo-Bonfante P. 1972. Inibitori naturali della germinazione. Un esempio: *Tuber melanosporum* Vitt. *Informatore Botanico Italiano*, 4: 156-159.
- Ozino Marletto O.I.; Sartoris A. 1978. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. V. La blastofora delle aree bruciate nell'italia centrale. *Allionia*, 23: 91-94.
- Palenzona, L. 1969. Mycorrhizal synthesis between *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. and seedlings of *Corylus avellana* L. *Allionia* 15: 121-132.
- Palenzona, M., Chevalier, G., and Fontana, A. 1972. Sintesi micorrizica tra i miceli in coltura di *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, e *T. rufum* e semenzali di conifere e latifoglie. *Allionia* 18:41-52.
- Papa G. 1979. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. VI. Analisi spettrofotometriche di estratti di terreni tartufigeni ed azione inibente la germinazione. *Allionia*, 23: 95-102.



## Fase 1. Bibliografía

- Papa G. 1981. Purification of the inhibitory principle of *Tuber melanosporum* Vitt. *Allionia*, 24: 125-126.
- Pargney J.C. 1990. Essais de caractérisation cytochimique des structures de l'interface au niveau du réseau de Hartig dans l'association ectomycorhizienne entre la truffe (*Tuber melanosporum*) et le noisetier (*Corylus avellana*). *Can. J. Bot.*, 68: 2722-2728.
- Pargney J.C. 1991. Cytochimie ultrastructurale des interfaces présentes dans l'association ectomycorhizienne *Tuber melanosporum* Vitt./*Corylus avellana* L. *Cryptogamie*, 12: 47-61.
- Pargney, J.C.; Leduc, J.P. 1990. Ultrastructural study of the ectomycorrhizal symbiosis walnut truffle (*Corylus avellana* -*Tuber melanosporum*). *Bulletin de La Societe Botanique de France-Lettres Botaniques*, 137: 21-34.
- Parguey-Leduc A.; Janex-Favre M.C. 1987. Formation et évolution des ascospores de *Tuber melanosporum* (truffe noire du Périgord, discomycètes). *Can. J. Bot.*, 65: 1491-1503.
- Parguey-Leduc A.; Janex-Favre M.C. 1990. L'appareil sporophytique et les asques du *Tuber melanosporum* Vitt. (truffe noire du Périgord, discomycètes). *Cryptogamie*, 11: 47-68.
- Parguey-Leduc A.; Montant C. 1987. Morphologie et structure de l'ascocarpe adulte du *Tuber melanosporum* Vitt. (truffe noire du Périgord, discomycètes). *Cryptogamie*, 8: 173-202.
- Peñuelas Rubira, J. 1993. El cultivo de la planta forestal en España. *Montes*, 31: 55-60.
- Peñuelas Rubira, J. 1993. Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas. *Montes*, 33: 84-97.
- Peñuelas Rubira, J. 1995. Calidad de la planta forestal: normativa y control. Ponencia presentada en las Jornadas sobre nuevas técnicas de producción de planta forestal. Junta de Castilla y León, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Dirección General del Medio Rural. Molinos de Duero, Soria. 7-10 Octubre de 1995.
- Petersen, Roger G. 1985. *Design and Analysis of Experiments*. Marcel Dekker, Inc.; New York.
- Pirazzi, R. 1986. Micorrizzazione di *Pinus halepensis* Mill. e *Pinus nigra* Arnold con *Tuber melanosporum* Vitt. e *Tuber brumale* Vitt. var. *moschatum* Ferry. *Mic. Ital.*, 1: 5-11.
- Pirazzi, R. 1989.. Micorrizzazione artificiale con miceli isolati in vitro di *Tuber melanosporum* Vitt. e *T. magnatum* Pico. In: Bencivenga, M., & Granetti, B. (eds.). *Proc. Atti del II Congresso Internazionale sul Tartufo*. Spoleto, Italy, November, 1988. pp. 173-184.
- Poiteau, N.; Villenave, P.; Baudet, D.; Delmas, J. 1983. Croissance in vitro du mycélium de *Tuber melanosporum* Vitt. et de certains compétiteurs en fonction du pH du milieu. *Académie d'Agriculture de France*, 1: 1363-1370.
- Rauscher, T.; Agerer, R. und G. Chevalier. 1995. Ektomykorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. *Nova Hedwigia* 61 (3-4): 281-322.

## Fase 1. Bibliografía

- Rodriguez Barreal; Saiz de Omeñaca. 1989. Efectos positivos de la micorrización controlada, con el hongo *Tuber melanosporum* Vitt., de la especie forestal *Corylus avellana* L. obtenido mediante reproducción vegetativa. Bol. San. Veg. Plagas, 15 : 207-214.
- Siegel, Sidney; Castellan, N. John, Jr. 1988,1956. Nonparametric Statistics For The Behavioral Sciences, Second Edition. McGraw-Hill Book Company; New York
- Steel, R. y J. Torrie. 1980.1960. Principles and Procedures of Statistics A Biometrical Approach, Second Edition. McGraw-Hill Publishing Company; New York.
- Vrot, F. 1977. Influence de certains facteurs sur la croissance du mycelium truffier in vitro University de Nancy I, U.E.R. Physique, Chimie, Biologie. These.
- Weisberg, Sanford 1985. Applied Linear Regression, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.; New York, NY
- Zambonelli A.; Govi G. 1983. Micorrización in semenzaio di *Quercus pubescens* Will. con especie del genere *Tuber*. Micologia Italiana, 1: 17-22.
- Zambonelli, A. y G. Govi. 1991. Competizione fra *Tuber albidum* ed altri funghi: 3° contributo. Mic. Ital. 3: 15-12.
- Zambonelli, A.; Salomon, S. y A. Pisi. 1993. Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. Mic. Ital. 3: 73-90.
- Zambonelli, A.; Salomon, S. y A. Pisi. 1993. Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. Mic. Ital. 3: 73-90.
- Zhang, B.C. and Minter, D.W. 1988. *Tuber hymalayense* sp. nov. with notes on himalayan truffles. Trans. Br. mycol. Soc. 91 (4), 593-597.

## **2ª fase: Descripción de las micorrizas de *Tuber melanosporum***

Descripción de las micorrizas de *Tuber melanosporum* basada en las observaciones de plantas de *Quercus ilex*, inoculadas comercialmente por *Micotec, Técnicas de Micología Aplicada*, de Montalbán, Teruel.

### **Caracteres macroscópicos**

Morfología: monopodial, cilíndrica o engrosada en el ápice (Diapositivas 1, 2, 3); presencia frecuente de espínulas e hifas externas al manto (D1, 2, 4).

Color: marrón de muy claro a oscuro (D1,2,3,4) ocasionalmente con manchas rojizas o marrón más oscuro (D1).

Dimensiones: (Fig. 1) Longitud de un sistema de micorrizas: 3-6(-10) mm;  
Longitud de una micorriza: 0.5-1.5(-4)mm;  
Diámetro de una micorriza: 0.2-0.4 mm.

Superficie de manto: Suave, con aspecto de papel de lija muy fina (D4).

Rizomorfos: no observados.

### **Caracteres microscópicos**

Anatomía del manto: Pseudoparenquimatoso de tipo puzzle (D8, 9, 10, 14), compacto y con paredes gruesas (D5, 13, 14).

Hifas externas al manto: transparentes o amarillo claro; frecuentes y abundantes (D9, 12) con diámetro de 3.2-3.6  $\mu\text{m}$  (Fig. 2). Septos muy abundantes, y frecuentemente localizados cerca de los puntos de ramificación de las hifas (D11). Su longitud es irregular y pueden estar situadas en cualquier zona de la micorriza.

Cistidios: Espínulas frecuentes en el ápice de las micorrizas (D1, 5, 15, 16); Longitud de 120-150  $\mu\text{m}$  (Fig. 3), raramente 200  $\mu\text{m}$ ; Diámetro decreciente de 3.0 a 3.5  $\mu\text{m}$  en la base y 2.4 a 2.8  $\mu\text{m}$  en el extremo; transparentes y con el extremo redondeado (D7,15,16); ocasionalmente con ramificaciones en ángulo aproximadamente recto (D6).  
Generalmente más finas que las hifas externas al manto y de longitud regular (D 12, 16).

## **2ª fase: Descripción de las micorrizas de *Tuber melanosporum***

### **Diapositivas: 1-16**

- 1: La micorriza de *Tuber melanosporum* tiene un color marrón a veces con manchas más oscuras o rojizas. Su forma es monopodial, cilíndrica o engrosada en el ápice. Las espínulas típicas suelen estar en el ápice. Las hifas externas al manto abundan en el ápice pero pueden estar en cualquier parte de la micorriza.
- 2: Las micorrizas también pueden tener color marrón muy oscuro y no siempre tienen espínulas. Las hifas externas al manto son muy finas y están cerca del ápice. La morfología cilíndrica es frecuente.
- 3: Dentro de un sistema de micorrizas hay variaciones de color. El rango comprende desde marrón muy claro hasta muy oscuro.
- 4: La textura de la superficie del manto es relativamente suave, con aspecto de papel de lija muy fina. Tiene apariencia un poco granular, y brillante con reflejos.
- 5: El manto es muy compacto y las espínulas transparentes.
- 5a: Id.
- 6: La anatomía del manto es pseudoparenquimatosa del tipo puzzle; las espínulas a veces tienen ramificaciones en ángulo más o menos recto.
- 7: Las espínulas de micorrizas de *T. melanosporum* son delgadas, con puntas redondas y diámetro decreciente.
- 8: Las hifas externas al manto son transparentes o un poco amarillas y salen del manto de tipo puzzle.
- 9: Las hifas externas del manto son muy abundantes, y no tienen ornamentaciones características.
- 10: El manto de tipo puzzle tiene coloración irregular.
- 11: Las hifas externas al manto tienen septos muy frecuentes, aproximadamente cada 30  $\mu\text{m}$ , y sin fíbulas.
- 12: Las hifas externas al manto tienen septos típicos, casi siempre a 2  $\mu\text{m}$  de las ramificaciones.
- 12a: Id.

Fase 2. Tuber melanosporum

13: El manto de tipo puzzle es muy regular.

14: El manto de tipo puzzle tiene células con paredes gruesas.

15: Las micorrizas tienen aspecto brillante con abundancia de espínulas de extremos redondeados y diámetro decreciente.

16: Las espínulas son muy regulares y no siempre tienen ramificaciones.

### **3ª fase: Descripción de las micorrizas de *Tuber brumale***

Descripción de las micorrizas de *Tuber brumale* basada en las observaciones de plantas de *Quercus ilex*, inoculadas en el Centro de Investigación Forestal de Valonsadero.

#### **Caracteres macroscópicos**

Morfología: monopodial, cilíndrica o engrosada en el ápice (Diapositivas 1, 2, 3,4); presencia frecuente de espínulas y de hifas externas al manto que tienen la apariencia de algodón muy fina alrededor de la micorriza (D. 2, 3, 4).

Color: de dorado muy claro a dorado oscuro (D. 1,2,3,4) .

Dimensiones (Fig. 1):

Longitud de una micorriza: 0.7-1.2 mm;

Diámetro de una micorriza: 0.2-0.4 mm.

Superficie del manto: Suave, con abundancia de hifas finas externas que forman una nube alrededor de la micorriza (D. 2,3,4).

Rizomorfos: no observados.

#### **Caracteres microscópicos**

Anatomía del manto: Pseudoparenquimatoso de tipo puzzle (D. 15, 16, 17, 18), compacto y con paredes gruesas.

Hifas externas al manto: transparentes o amarillo claro; frecuentes y muy abundantes (D. 2,3,4) con diámetro muy variable de 3.0 a 6.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 2). Septos presentes, pero no localizados cerca de los puntos de ramificación de las hifas (Fig. 2). Su longitud es irregular y pueden estar situadas en cualquier zona de la micorriza (D. 7,8).

Cistidios: Espínulas frecuentes en el ápice de las micorrizas, pero pueden salir de toda la zona de raíz micorrizada (D. 1, 5, 6,); Longitud de 50-90  $\mu\text{m}$  , raramente 100  $\mu\text{m}$ , sin ramificaciones (Fig. 3); Diámetro decreciente de 4.0 a 6.0  $\mu\text{m}$  en la base y 1.6 a 2.8  $\mu\text{m}$  en el extremo, transparentes y con el extremo redondeado (D. 7,13,14); la base de las espínulas está un poco hinchada como un bulbo y frecuentemente con un septo (Fig. 3); Generalmente más finas que las hifas externas al manto y de longitud regular (D. 19).

**Diapositivas: 1-19**

- 1: La micorriza de *Tuber brumale* tiene un color dorado o dorado oscuro. Su forma es monopodial, cilíndrica o engrosada en el ápice. Las espínulas típicas suelen estar en toda la zona micorrizada de la raíz. Las hifas externas al manto abundan en el ápice pero pueden estar en cualquier parte de la micorriza.
- 2: Las micorrizas de *Tuber brumale* tienen hifas externas al manto muy abundantes e irregulares, con aspecto de una nube de algodón muy fino. La morfología engrosada en el ápice es frecuente.
- 3: Duplicada
- 4: Duplicada
- 5: Las hifas externas al manto forman una red que captura partículas de suelo. Las espínulas son transparentes o un poco amarillas y muy regulares en longitud.
- 6: Duplicada
- 7: El manto es muy compacto con aspecto entretelado. Las hifas externas al manto son abundantes.
- 8: Duplicada
- 9: Las hifas externas del manto son encorvadas, de diámetro muy variable, algunas muy gruesas. No tienen ornamentaciones características. Capturan tierra en la superficie de la micorriza.
- 10: Duplicada
- 11: Las espínulas de micorrizas de *T. brumale* son delgadas, con puntas redondas y diámetro decreciente. No tienen ramificaciones ni septos excepto en la base.
- 12: Duplicada
- 13: Las espínulas son transparentes o un poco amarillas, engrosadas en la base. Son muy regulares de longitud.
- 14: Duplicada
- 15: Las micorrizas de *Tuber brumale* tienen el manto pseudoparenquimatoso del tipo puzzle.

Fase 3. *Tuber brumale*

16: Duplicada

17: El manto de tipo puzzle es muy regular; tiene células con paredes gruesas.

18: Duplicada

19: Las espínulas son engrosadas en la base, muy regulares de longitud y sin ramificaciones ni septos.



**3ª fase: Metodología y resultados de la síntesis de micorrizas entre *Quercus ilex* y 3 especies de hongos del género *Tuber*.**

**Las fases del trabajo son:**

1. Estratificación de los carpóforos de *Tuber*
2. Estratificación y germinación de las bellotas de *Quercus ilex*
3. Preparación de sustratos y plantación de las bellotas germinadas
4. Preparación de la suspensión de esporas e inoculación de las plantas
5. Cultivo en invernadero durante 3-7 meses
6. Examen de los sistemas radiculares

**1. Estratificación de los carpóforos de *Tuber***

Los carpóforos de *T. melanosporum* se fueron comprados a un trufero que los recogió en la provincia de Soria en enero de 1995. Los carpóforos de *T. brumale* fueron comprados a un trufero que los recogió en la comarca de El Solsonés (Lérida) en Marzo de 1995. Los carpóforos de *Tuber sp.* procedían de China y fueron comprados a un trufero de Soria. Estos esporocarpos estaban a la venta en los mercados de España al precio de 14,000 Pts/ kilo (primera calidad). Creemos que pertenecen a la especie *Tuber indicum*.

Después de limpiarlos con un cepillo se sumergieron en alcohol (70%) durante dos minutos, y en alcohol (96%) otros 2 minutos y después se flamearon. Estuvieron estratificados en arena estéril, dentro de un contenedor tapado en una cámara a 4-5°C durante un mínimo de 60 días.

**2. Estratificación y germinación de las bellotas**

Aproximadamente 800 bellotas previamente estratificadas de *Quercus ilex* procedentes de Pinilla de Fermoselle en Zamora fueron lavadas durante 24 horas en agua corriente y después desinfectadas en agua oxigenada durante una hora y, finalmente, lavadas en agua estéril para quitar el exceso de desinfectante.

Las bellotas se dispusieron en bandejas en un sustrato de turba:vermiculita, (1:1), esterilizado dos veces a 120°C. Las bandejas se

guardaron en una cámara oscura a 22°C durante 15 días. Al final de este periodo el porcentaje de germinación fue del 80%.

### 3. Preparación de sustratos y plantación de las bellotas germinadas

Suelos de la zona trufera fueron recogidos para probar la influencia del sustrato. Del Monte de Utilidad Publica nº300, Término municipal de El Cubo de la Solana, recogimos dos muestras: El Cubo 1 y El Cubo 2. Del Monte de Utilidad Publica nº363, Término municipal de Cabréjas del Pinar, recogimos otras dos muestras: Cabréjas 1 y Cabréjas 2. Las 4 muestras fueron traídas al laboratorio y tamizadas (2mm) para eliminar raíces, semillas y piedras. Los suelos se pasteurizaron durante 1 hora, a 100°C; los suelos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvieron a pasteurizar 24 horas más tarde. Después se secaron al sol.

El pH (agua) de los suelos recogidos fue:

Suelo	pH
El Cubo 1	8,68
El Cubo 2	8,72
Cabréjas 1	7,76
Cabréjas 2	7,67

La vermiculita y turba fueron esterilizadas en el autoclave a 120°C. durante 60 minutos, dejadas a temperatura ambiente y esterilizadas por segunda vez a 120°C. durante 60 minutos, 24 horas más tarde.

Los suelos de zonas de trufa natural se mezclaron con vermiculita esterilizada para airear el sustrato (3:1 suelo:vermiculita en volumen). El quinto sustrato fue una mezcla de turba:vermiculita, 1:1 en volumen a cuál añadimos 200 g CaCO<sub>3</sub> / L de sustrato para elevar el pH a 6,7-6,8.

Antes de plantar las bellotas germinadas, cortamos las raíces más largas dejando una longitud máxima de 10-15cm y las sumergimos durante 5 segundos en una solución de benomyl (1g/L agua) para prevenir la aparición de "damping off". La siembra se realizó en contenedores de polietileno de 450cc lavados con lejía y aclarados en agua antes de llenarlos con el

sustrato. Las plantas se mantuvieron en un invernadero durante 2 meses antes de ser inoculadas.

#### 4. Preparación de la suspensión de esporas e inoculación de las plantas

Los carpóforos se sacaron de la arena y se limpiaron en agua corriente. Los examinamos para quitar esporocarpos dañados. Eliminamos el peridio con un bisturí y los cortamos en secciones transversales para examinar la gleba y eliminar esporocarpos de identificación cuestionable. La gleba se trituró con una batidora de cocina hasta tener una pasta homogénea. La pasta se machacó 10-15 minutos más en un mortero hasta tener 1/3-1/2 de los ascos rotos, sin dañar las esporas.

La pasta se diluyó con agua para tener una solución fácil de dispensar con una pipeta automática. Cada planta recibió 10 ml. de solución. Las concentraciones de esporas fueron:

*T. melanosporum*  $2 \times 10^6$  esporas/planta

*T. brumale*  $7 \times 10^6$

*T. sp.*  $5 \times 10^6$

En los 5 diferente sustratos tenemos plantas inoculados con *T. melanosporum*, con *T. brumale* y plantas control no inoculadas. En el sustrato de vermiculita-turba tenemos plantas inoculadas con *T. sp.* y plantas control.

#### 5. Cultivo en el invernadero durante 3-7 meses

En total, 210 plantas se mantuvieron en el invernadero durante el verano y el otoño. Las plantas se regaron con agua destilada para evitar la posible contaminación con esporas de otros hongos. Las necesidades de riego fueron determinadas en función de la humedad del sustrato. Registramos la temperatura ambiente y la del suelo. Cuando la temperatura ambiente bajó en Noviembre, pusimos calefacción en el invernadero para prevenir temperaturas inferiores a 3° C.

#### 6. Examen de los sistemas radiculares

Sacamos cada planta del contenedor cuidadosamente con todas las raíces finas. Lavamos la planta en agua corriente para separar la mayor parte del suelo adherido a las raíces. Las partículas más finas de suelo fueron

eliminadas con pincel y pinzas bajo la lupa binocular. Para cada sistema radicular evaluamos: el tipo de desarrollo, la abundancia de raíces finas y la presencia de micorrizas de la especie de *Tuber* inoculada y la presencia de otras micorrizas contaminantes. Empezamos en el cuello de planta y continuamos hasta las puntas.

### Resultados

Los resultados de la Tabla 1 indican que tenemos una diferencia importante en el éxito de colonización entre suelos truferos y sustrato artificial. En todos los 4 suelos truferos encontramos más plantas con colonización que sin colonización, pero con el sustrato de turba:vermiculita, solo observamos colonización en 3 de las 24 plantas examinadas. En el caso de *T. sp.*, no tenemos datos de los suelos truferos.

**Tabla 1. Colonización de plantas *Quercus ilex* inoculado con tres diferentes especies de *Tuber* por 5 diferentes sustratos.**

	Cabr. 1	Cabr. 2	Cubo1	Cubo2	Tur:Ver	TOTAL
<i>T. melanosp.</i>						
si	5	4	6	5	0	20
no	1	3	0	3	5	12
<i>T. brumale</i>						
si	8	6	8	5	1	28
no	0	1	0	1	4	6
<i>T. sp.</i>						
si	0	0	0	0	2	2
no	0	0	0	0	12	12
TOTAL	14	14	14	14	24	80

### Discusión

El objetivo del estudio de sustratos era de evaluar la influencia de los suelos de zona trufera en el éxito de colonización. Los resultados en la Tabla 1 pertenecen a 80 plantas evaluadas para colonización después de inoculación con suspensiones de esporas. El primer examen de las plantas se ocurrió 3 meses después de la inoculación, y los siguientes en 6, 9 y 11 meses. En el primer examen, encontramos un nivel de colonización muy bajo y con ectomicorrizas solo en el cuello de la raíz, la zona de más proliferación de

raíces nuevas. Dos de los 3 resultados negativos de *T. melanosporum* ocurrieron en este primer examen.

Con más tiempo después de inoculación observamos un aumento de nivel de colonización en el sistema radicular, hasta el último examen en que encontramos raíces muy oscuras en estado de senescencia. Esto puede haberse debido a un cambio fuerte en la temperatura del invernadero con un periodo de condiciones demasiado secas en el verano.

Por los cambios de nivel de colonización que encontramos a lo largo del tiempo, estos resultados deben ser entendidos cualitativamente. No podemos concluir que Cabrejas 1 es mejor que Cubo 2 como sustrato para colonización de plantas de *Quercus ilex* inoculado con esporas de *Tuber*. Pero con la falta de éxito de colonización en el sustrato de turba y vermiculita en las mismas condiciones de inoculación y de mantenimiento en el invernadero, podemos concluir que los suelos de zonas truferas son mucho más adecuados.

Una hipótesis para esta diferencia es la humedad que mantuvo el sustrato artificial con el mismo régimen de riegos. Sabemos que *T. melanosporum* está muy bien adaptada a condiciones de sequía. Los suelos de zonas truferas tienen niveles entre 63% y 87% de arena, niveles que facilitan el drenaje de agua. Hubiera sido interesante tener plantas inoculadas con *T. sp.* en suelos truferos también.

Otra hipótesis es la diferencia en pH. Los suelos de zonas truferas tienen un pH entre 7.7 y 8.7, mientras que el sustrato de turba:vermiculita con adiciones de 200 g CaCO<sub>3</sub> / L de sustrato tiene el pH a 6,7-6,8. No pudimos elevarlo más, incluso con aumentos de CaCO<sub>3</sub>.

Con este estudio concluimos que el suelo es un factor fundamental para la simbiosis entre la planta y el hongo. Para producción en escala grande con sustratos artificiales, será importante tener la humedad y pH bien controlados.

**4ª fase: Clave sinóptica para la identificación de *Tuber melanosporum* y otras ectomicorrizas de encina en vivero**

Esta clave sinóptica incluye cuatro variables importantes para caracterizar las diferentes ectomicorrizas encontradas en este estudio. Estas variables son: 1) el color, 2) la morfología de ápices no ramificados, 3) la anatomía del manto y 4) las estructuras externas al manto. Para cada variable hemos elegido varios valores que describen las diferentes ectomicorrizas o condiciones de senescencia o no micorrización.

Cada especie o condición puede exhibir más de una apariencia en función de la edad y madurez de la colonización y también del estado fisiológico o sanitario de la raíz. Por ejemplo, las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum*, cuando son jóvenes, son más doradas o rojizas. Cuando se hacen más viejas tienen un color marrón más oscuro. Y si la raíz ha sufrido una fuerte desecación, las micorrizas son negras y no funcionales por lo que deben considerarse senescentes. Un ápice de *Quercus ilex* sin colonización micorrízica tiene un aspecto casi translucido, y se pueden distinguir las células corticales al microscopio estereoscópico. Pero, a medida que aumenta su edad y avanza el proceso de lignificación, su color se vuelve más oscuro y aparecen bandas marrones. Los valores de las variables recogidos en la clave para cada tipo de ectomicorriza o condición de ápice, son los más representativos o los que se encuentran con más frecuencia.

La clave está construida como una matriz y es fácil de expandir añadiendo filas —variables o valores de variables— o columnas —taxones o condiciones— a medida que se dispone de más información. En esta clave particular, cada uno de los taxones o condiciones está definido por un vector diferente de los demás, excepto en el caso de *T. melanosporum* y *T. sp.* De momento no disponemos de la información necesaria para distinguir estos dos tipos de micorrizas de forma concluyente. *T. sp.* son las micorrizas formadas en plantas inoculadas con carpóforos procedentes de China. Creemos que estos carpóforos pertenecen a *T. indicum*. en base a la descripción de Zhang y Minter (1988). Las ectomicorrizas formadas por este hongo tienen un manto pseudoparenquimatoso de tipo puzzle, típico de las especies de *Tuber*, pero en nuestras síntesis en sustrato de turba y vermiculita, no observamos ningún tipo de cistidio específico de *T. indicum*. La abundancia de cistidios depende frecuentemente de la humedad del sustrato (Agerer 1995, pers.

com.), y es posible que con otro sustrato, hubiéramos encontrado apariencias distintas.

De momento, no hay una buena descripción de esta ectomicorriza publicada, pero estamos en colaboración con otros grupos sobre este tema (Bencivenga 1996, pers. com.; Agerer 1995, pers com.). Hasta la fecha disponemos de una descripción de la red superficial del manto y de las hifas externas del manto presentes en nuestras inoculaciones. (Ver Fase 5, libro de fotos de ectomicorrizas).

La clave está basada en el estudio de plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum* de viveros de España, incluidas nuestras inoculaciones en Valonsadero. El Contaminante 1 (CO1) es la ectomicorriza de *Sphaerospora brunnea* (Meotto y Carraturo 1987-88; Danielson 1984). No conocemos la identidad del micobionte de las micorrizas contaminantes CO2, CO3, y CO4, pero esto no es obstáculo para describirlas y estudiar su ecología y competitividad en el futuro (Bencivenga et al. 1995; Zambonelli y Govi 1991; Mamoun y Olivier 1993.). El analista puede consultar descripciones más detalladas de *T. melanosporum*. y *T. brumale* en Palenzona, Chevalier y Fontana (1972); Chevalier (1973); Zambonelli et al. (1993); y Rauscher, Agerer y Chevalier (1995).

Esta clave no pretende ser exhaustiva, sino ayudar al analista a distinguir los contaminantes más frecuentes en los viveros españoles. Idealmente, el analista debería tener la responsabilidad de colaborar en la descripción de nuevas ectomicorrizas encontradas y, de esta manera, la clave se expandirá y mejorará.

**Clave sinóptica para la identificación de *Tuber melanosporum* y otras ectomicorrizas de encina en vivero**

VARIABLES \ TAXONES O CONDICIONES	<i>T.mel</i>	<i>T.bru</i>	<i>T.sp</i>	CO1	CO2	CO3	CO4	Senes	No Mic
<b>COLOR</b>									
Blanco grisáceo					x				x
Blanco con bandas marrones									x
Marrón dorado	x	x	x						
Marrón rojizo	x	x					x		
Marrón oscuro	x	x	x	x		x	x		x
Marrón con ápices blancos				x					
Negro				x		x		x	
<b>MORFOLOGIA DE PUNTAS NO RAMIFICADAS</b>									
Cilíndrica	x	x	x	x	x	x	x		
Cilíndrica, hinchada en el ápice	x	x	x			x			
Cilíndrica, con estrangulamientos				x					
Irregular, más estrecha en el ápice								x	x
<b>ANATOMIA DEL MANTO</b>									
Sin manto estructurado								x	x
Plectenquimatoso					x				
Plect. con estrang. en los septos				x					
Pseudoparenquimatoso, puzzle	x	x	x						
Pseudoparenquimatoso, poligonal						x	x		
<b>ESTRUCTURAS EXTERNAS AL MANTO</b>									
Ausencia								x	
Espínulas sin ramificaciones		x							
Espínulas con ramif. en ángulo recto	x								
Pelos radiculares									x
Hifas externas al manto con fíbulas					x				
Hifas externas al manto sin fíbulas			x	x		x	x		

*T. mel* = *Tuber melanosporum*

*T. bru* = *T. brumale*

*T. sp* = *T. sp.*, de carpoforos procedentes de China

CO = Contaminante

Senes = Senescente

No Mic = No Micorrizada



## Bibliografía

- Agerer, R. (ed.). 1987-95. Colour Atlas of Ectomicorrhizae, 1st-9th delivery. Einhorn-Verlag, Schwabisch Gmund.
- Bencivenga, M.; Di Massimo, G.; Donnini, D. y M. Tanfulli. 1995. Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene: Nota 1-Inquinanti in vivaio. *Mic. Ital.* **2**: 167-178.
- Chevalier, G. 1973. Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber brumale* Vitt. à partir de cultures pures du champignon. *Ann. Phytopathol.* **5** (2): 163-182.
- Danielson, R.M. 1984. Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerosporella brunnea* (Pezizales). *Mycologia* **76** (3): 456-461.
- Mamoun, M. y J.M. Olivier. 1993. Competition between *Tuber melanosporum* and other ectomycorrhizal fungi under two irrigation regimes. 1. Competition with *Tuber brumale*. *Plant and Soil* **149**: 211-218.
- Meotto, F. y P. Carraturo. 1987-88. Ectomicorrizia di *Sphaerosporella brunnea* (A.&S.) Svrcek & Kubicka in piantine tartufigene. *Allionia* **28**:109-116.
- Palenzona, M.; Chevalier, G. y A. Fontana. 1972. Sintesi micorrizica tra miceli in coltura de *Tuber brumale*, *Tuber melanosporum*, *Tuber rufum* e semenzali de conifere e latifoglie. *Allionia* **18**: 41-52.
- Rauscher, T.; Agerer, R. und G. Chevalier. 1995. Ektomykorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. *Nova Hedwigia* **61** (3-4): 281-322.
- Zambonelli, A. y G. Govi. 1991. Competizione fra *Tuber albidum* ed altri funghi: 3° contributo. *Mic. Ital.* **3**: 15-12.
- Zambonelli, A.; Salomon, S. y A. Pisi. 1993. Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber* spp. su *Quercus pubescens* Willd. *Mic. Ital.* **3**: 73-90.
- Zhang, B.C. and Minter, D.W. 1988. *Tuber himalayense* sp. nov. with notes on himalayan truffles. *Trans. Br. mycol. Soc.* **91** (4), 593-597.

**4ª fase: Método de muestreo de raíces de plantas de *Quercus ilex* para estimar su nivel de colonización con *Tuber melanosporum* y con otras micorrizas contaminantes**

**Introducción:**

Examinar plantas para determinar su nivel de micorrización es un proceso muy costoso en tiempo de analista de laboratorio. Por eso es importante encontrar un método que minimice el tiempo dedicado a cada planta manteniendo la certeza de que el muestreo es representativo. En el método francés (Chevalier y Grente 1978), la planta entera es examinada, y se le asigna, de manera subjetiva, un nivel de micorrización entre 0 y 5. Este método tiene la ventaja de ser rápido, pero tiene el inconveniente de depender demasiado del criterio del analista.

El reciente método italiano (Bencivenga et al. 1995) recomienda tomar al menos 8 raíces (4 de la parte distal y 4 de la parte proximal del cepellón) y observar los 50 primeros ápices de cada raíz, con un total mínimo de 400 ápices. Este sistema de muestreo está fundado en la correlación muy baja que ellos encuentran entre la parte distal y la parte proximal de la planta, en su estudio de 10 especies de árboles diferentes, a pesar de que en *Quercus ilex* encontraron una correlación alta entre ambas partes. Este método tiene la ventaja de ser muy objetivo, pero tiene el inconveniente de ser laborioso.

Nuestro primer objetivo ha sido comprobar si en realidad existen diferencias entre la parte distal y la parte proximal de la planta de *Quercus ilex* para ver si es necesario hacer una evaluación independiente de cada parte de la planta. El segundo objetivo ha sido determinar el mínimo número de ápices que es necesario estudiar para estimar la situación micorrícica de la planta con fiabilidad.

Es importante realizar este estudio sobre plantas similares a las que van a ser analizadas. Por ello hemos excluido las plantas que, en una primera observación al microscopio estereoscópico, presentaron graves carencias de raíces tróficas o de micorrizas, o niveles inaceptables de contaminantes.

## **Material y métodos**

### Recolección de datos

Treinta plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum* procedentes de viveros españoles y franceses, éstas últimas certificadas por INRA, fueron evaluadas de la siguiente manera: la planta fue sacada del contenedor y cuidadosamente lavada para eliminar todo el sustrato. Para ello la planta se mantuvo en un baño durante varias horas para ablandar el sustrato que después se fue desprendiendo con movimientos suaves para evitar romper los ápices. La planta entera se extendió en una bandeja con agua.

Posteriormente, la planta entera fue examinada al microscopio estereoscópico en una primera observación tomando nota de la abundancia de raíces tróficas, su nivel de colonización, y la presencia de contaminantes. Las plantas que carecían de abundantes raíces tróficas, o cuya colonización micorrícica total era claramente inferior al 20%, o cuyo porcentaje de colonización con contaminantes era claramente superior al 50% fueron descartadas para no aumentar innecesariamente la variabilidad.

Después, se cortó el sistema radical en dos mitades, la proximal y la distal, y se cortó cada una de estas mitades en segmentos de aproximadamente 3 cm. Estos segmentos de raíces se distribuyeron homogéneamente en una placa de Petri de 17 cm de diámetro con agua y una cuadrícula de 1.5 cm x 1.5 cm en el fondo. La mitad, elegida al azar, aproximadamente de los cuadros se examinaron al microscopio estereoscópico contando el número de ápices perteneciente a cada uno de 3 grupos: "Micorrizado con *Tuber melanosporum*", "No micorrizado" o "Micorrizado con un contaminante". Los ápices senescentes se contaron como "No micorrizados". Todas las micorrizas cuya identificación ofrecía dudas al microscopio estereoscópico fueron observadas al microscopio óptico para determinar el simbionte con certeza.

### Métodos estadísticos

Hemos preferido el muestreo de ápices por cuadros al muestreo de ápices a lo largo de una raíz usado por Bencivenga et al. (1995) porque la probabilidad de que un determinado ápice pertenezca a una de las tres clases puede estar influida por la clase a la que pertenezcan los demás ápices de la

raíz secundaria. Esta falta de independencia afectaría a la validez de las inferencias estadísticas y se puede aminorar al contar los ápices comprendidos en un cuadrado que típicamente pertenecen a 3 ó 4 raíces secundarias en vez de a una sola como en el método de Bencivenga et al. (1995). Este método nos proporciona una visión más global de la planta al permitirnos observar más fragmentos de raíz secundaria de más zonas distintas del sistema radicular.

Para el análisis estadístico excluimos 6 plantas por falta de sistema radicular suficientemente desarrollado y 4 plantas con un alto nivel de contaminantes (mas del doble de ápices micorrizados con hongos contaminantes que con *T. melanosporum*). Las plantas incluidas en el estudio abarcaban todo el rango de situaciones que es razonable esperar.

El número de ápices que deben ser muestreados para estimar el porcentaje de *T. melanosporum* o de contaminantes viene dado por la ecuación (Krebs 1989):

$$n = \frac{t_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{d^2} \quad (1)$$

n - número de ápices

p - proporción de ápices con la micorriza de interés a ápices totales.

q - (1-p) Utilizaremos el máximo valor posible de p·q = 0.25

t<sub>α</sub> - Valor crítico de t

d - amplitud del intervalo de confianza

Resolviendo para d = 0.1 y α=0.05 (Bencivenga et al. 1995):

$$n = (1.98^2 \cdot 0.25) / 0.1^2 = 96$$

El número de ápices necesario para estimar el porcentaje de *T. melanosporum* (*T. melanosporum* /nº total de ápices) sería de 96. El número de ápices necesario para estimar el porcentaje de *contaminantes* (contaminantes/nº total de ápices micorrizados) sería también de 96, pero estas plantas sólo tienen algo menos de la mitad de sus ápices micorrizados, por lo que para examinar 100 ápices micorrizados, hay que examinar más del doble de esa cantidad, por lo que hemos elegido un tamaño de muestra de 250 ápices por planta.

La variable de interés en el estudio es la relación entre el número de micorrizas de *T. melanosporum* y el número de ápices no micorrizados, o el

número de ápices micorrizados con un contaminante. Esta relación puede ser expresada como porcentaje (Ej. una planta con 33 micorrizas de *T. melanosporum* y 66 ápices no micorrizados tendría  $33/(33+66) = 33\%$  de micorrizas de *T. melanosporum*). Y también puede ser expresada como proporción (Ej. la misma planta tendría una proporción de micorrizas de *T. melanosporum* de  $33/66 = 0.5$ ). Hemos preferido proporciones a porcentajes porque su distribución no acotada superiormente, a diferencia de los porcentajes, facilita el análisis estadístico.

Las variables del estudio han sido:

- 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

#### Comparación proximal / distal

Realizamos esta comparación mediante una *t de Student* de datos pareados por planta para determinar si existe una diferencia significativa entre la PT de la parte proximal y la PT de la parte distal del sistema radical. Repetimos el procedimiento para comparar la PC de la parte proximal y distal del sistema radical. En el caso de PC los datos fueron transformados ( $PC_t = \log(PC+0.01)$ ) para obtener una distribución normal. La unidad experimental fue la planta. Estimamos PT y PC en la parte proximal a partir de las proporciones observadas en 250 ápices de la parte proximal y PT y PC en la parte distal a partir de las proporciones observadas en 250 ápices de la parte distal.

#### Mínimo número de muestras

El objetivo del segundo análisis fue comprobar la validez del resultado de la ecuación (1) para determinar el mínimo número de ápices cuyo estado micorrícico es necesario determinar para estimar las proporciones PT y PC en una planta. Para ello, estimamos PT y PC en cada planta a partir de 500 ápices. Estos 500 ápices constituyen aproximadamente la mitad de los ápices de la planta. Hemos considerado las proporciones estimadas a partir de estos 500 ápices como las proporciones verdaderas de *T. melanosporum* (PT<sub>v</sub>) y de contaminantes (PC<sub>v</sub>) de la planta.

Las variables de interés en este análisis fueron:

1) la diferencia entre PTv y PT estimada a partir de un número de ápices  $x$  ( $x =$  número de ápices;  $50 < x < 400$  en incrementos de 50) para cada una de las plantas.

2) la diferencia entre PCv y PC estimada a partir de un número de ápices  $x$  ( $x =$  número de ápices;  $50 < x < 400$  en incrementos de 50) para cada una de las plantas.

A partir de los 500 ápices disponibles por planta (250 ápices de la parte distal y 250 ápices de la parte apical considerados indistintamente al no haber diferencias entre ambas, ver resultados), hicimos 10 grupos de  $x$  ápices ( $x = 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350$  y  $400$ ) de manera aleatoria, calculamos la diferencia entre la PT estimada a partir de cada uno de estos grupos de muestras ( $PT_x =$  PT estimada a partir de  $x$  muestras) y PTv y calculamos el intervalo de confianza ( $\alpha=0.05$ ) de esta diferencia. Repetimos el mismo proceso para PC.

Consideramos el tamaño de muestra aceptable aquel por encima del cual la amplitud del intervalo de confianza no disminuía de manera sustancial, siempre que incluyera 0.

## Resultados

### Comparación proximal / distal

Los resultados de la comparación de la PT(proximal) y la PT(distal) (Fig. 1) indican que no hay diferencias significativas entre ambas ( $p < 0.79$ ).

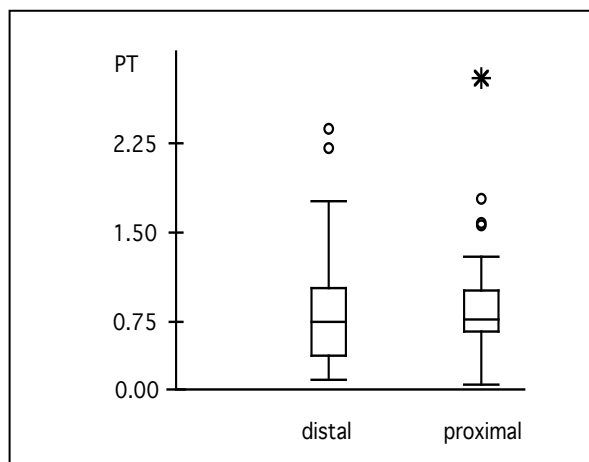


Fig. 1 *Box plot* de PT en la parte distal y en la parte apical de los sistemas radicales de las plantas.

Los resultados de la comparación de la PC(proximal) y la PC(distal) (Fig. 2) indican que no hay diferencias significativas entre ambas ( $p < 0.68$ ).

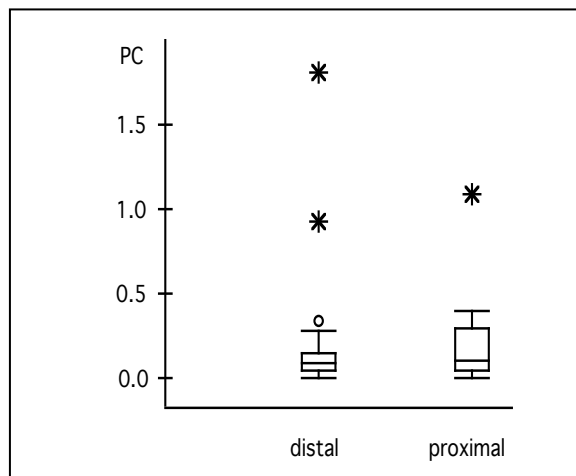


Fig. 2 *Box plot* de PC en la parte distal y en la parte apical de los sistemas radicales de las plantas.

#### Mínimo número de muestras

La amplitud de los intervalos de confianza (IC) de las diferencias entre  $PT_v$  y las  $PT$  calculadas a partir de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ápices están representados en la figura 3. Las diferencias entre  $PT_x$  y  $PT_v$  no fueron significativamente distintas de 0 para ningún tamaño de muestra. Cuando  $PT$  se estimó a partir de 100 ápices ( $PT_{100}$ ), la amplitud media de los intervalos de confianza obtenidos es demasiado alta ( $media(IC_{100}) = 0.17$ ) si tenemos en cuenta que las plantas ideales deberían tener una  $PT$  superior a 0.50 (33% de los ápices colonizados con *T. melanosporum*; ver informe fase 5). Cuando  $PT$  se estima a partir de 150 ápices ( $x = 150$ ), la amplitud media de los intervalos de confianza disminuye a la mitad, pero sigue siendo alta ( $media(IC_{150}) = 0.14$ ). Con  $x = 250$ , se alcanza una amplitud media de IC de 0.08. Aumentando el número de muestras, la amplitud de los intervalos de confianza continúa descendiendo, pero de forma menos acusada.

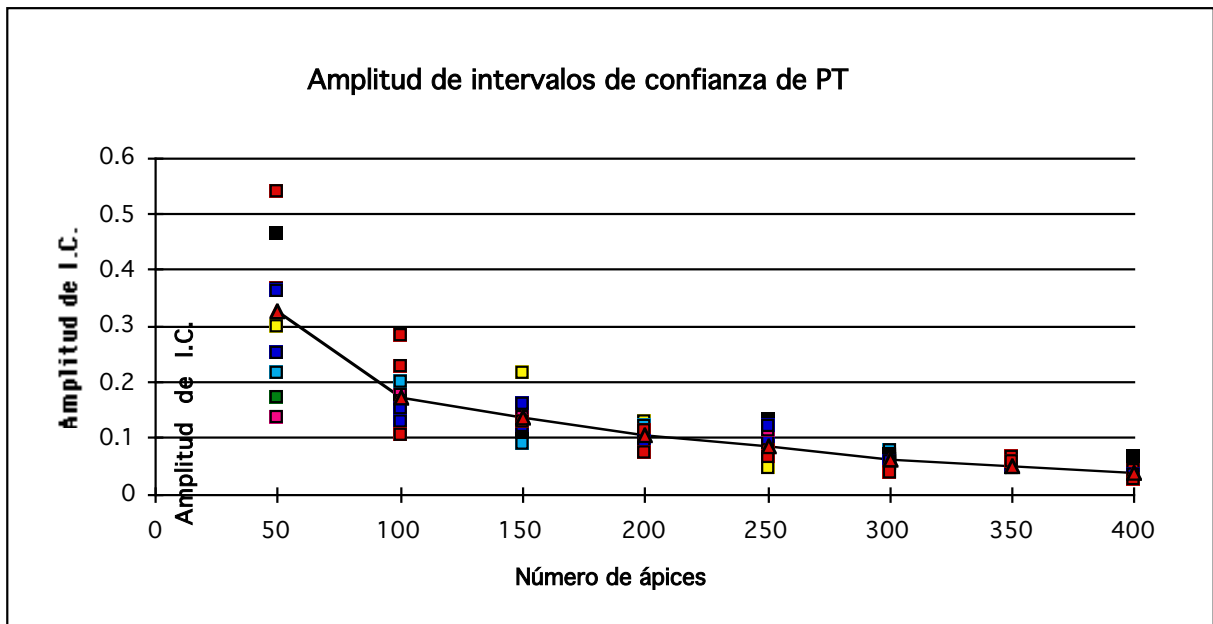


Figura 3. Amplitud de intervalos de confianza de diferencias entre PTv y PTx. En abscisas está representado el número de ápices evaluados utilizado para calcular PTx. En ordenadas está representada la amplitud de los intervalos de confianza de las diferencias PTv-PTx. La línea une los valores medios de los 10 intervalos de confianza calculados para cada tamaño de muestra.

La amplitud de los intervalos de confianza de las diferencias entre PCv y las PC calculadas a partir de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ápices están representados en la figura 4. Las diferencias entre PCx y PCv no fueron significativamente distintas de 0 para ningún tamaño de muestra. Cuando PC se estimó a partir de 10 ápices (PC<sub>100</sub>), la amplitud media de los intervalos de confianza obtenidos es demasiado alta ( $media(IC_{100}) = 0.09$ ) si tenemos en cuenta que las plantas ideales deberían tener una PC inferior a 0.33 (al menos el triple de micorrizas de *T. melanosporum* que de cualquier otro contaminante; ver informe fase 5). Cuando PC se estima a partir de 150 ápices ( $x = 150$ ), la amplitud media de los intervalos de confianza disminuye a la mitad, pero sigue siendo alta ( $media(IC_{150}) = 0.06$ ). Con  $x = 200$ , se alcanza una amplitud de IC de 0.047. Aumentando el número de muestras, la amplitud de los intervalos de confianza continúa descendiendo, pero de forma menos acusada.



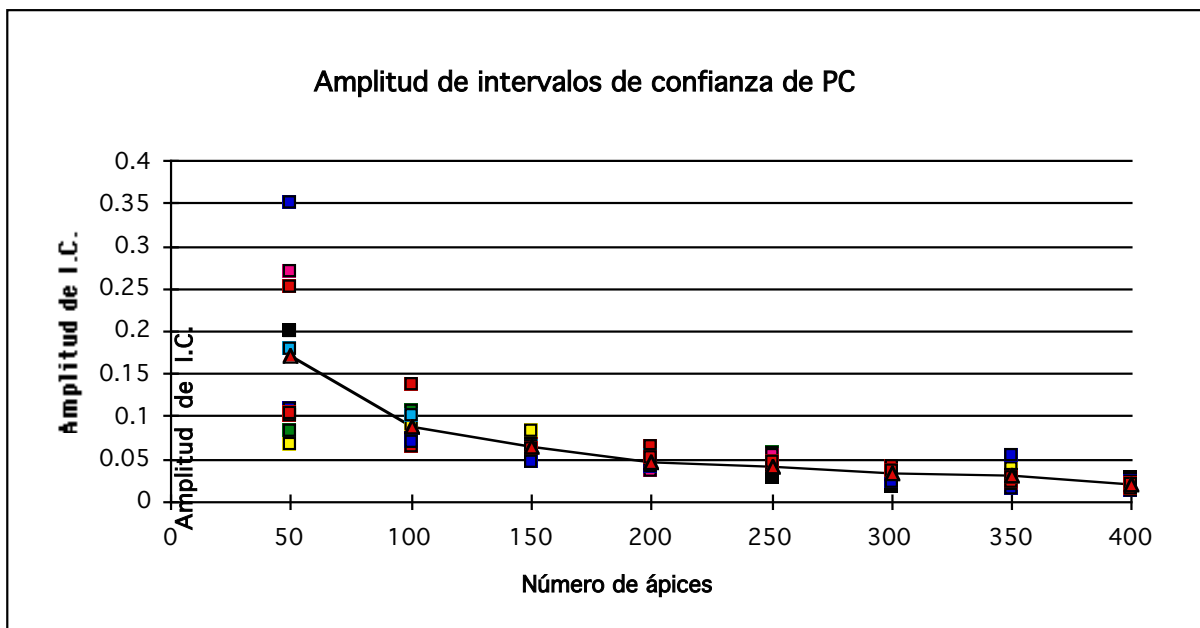


Figura 2. Amplitud de intervalos de confianza de diferencias entre PCv y PCx. En abscisas está representado el número de ápices evaluados utilizado para calcular PCx. En ordenadas está representada la amplitud de los intervalos de confianza de las diferencias PCv-PCx. La línea une los valores medios de los 10 intervalos de confianza calculados para cada tamaño de muestra.

## Discusión

Los resultados indican que no hay diferencias en las proporciones de *Tuber* o contaminantes entre la parte proximal y la parte distal del sistema radicular de la planta. Este resultado nos permite calcular ambas proporciones a partir de una única muestra de todo el sistema radical en conjunto, en vez de a partir de dos, con el consiguiente ahorro de tiempo en la preparación y conteo de la muestra.

La recomendación de Bencivenga et al. (1995) de muestrear por separado la parte proximal y distal está basada en sus datos obtenidos a partir de 10 especies. Esta recomendación nos parece justificada sin tener en cuenta la interacción entre la diferencia proximal/distal y la especie. Ni sus datos para *Q. ilex* ni los nuestros sugieren la necesidad de tomar dos muestras (proximal y distal) por planta.

Nuestros resultados están basados en plantas de *Quercus ilex* cultivadas e inoculadas en viveros especializados en producción de planta de calidad micorrizadas con *T. melanosporum*. Por ello, el método de muestreo derivado de estos resultados sólo debe ser aplicado a plantas de éstas características y debería ser testado antes de aplicarse a plantas de otras condiciones.

Las proporciones de *T. melanosporum* (PT) estimadas a partir del conteo de 100 ápices no son significativamente distintas de las obtenidas a partir del total de ápices, pero esto no es debido a una pequeña diferencia entre ambas, si no a la gran variabilidad. Incluso con 150 ápices, la variabilidad es, a nuestro juicio, demasiado alta. Por ello consideramos que el número mínimo de ápices recomendado por la fórmula (1) para PT es demasiado bajo. Esto puede ser debido al efecto de agregación que no es eliminado por completo al hacer el muestreo por cuadrados aleatorios.

El número de ápices examinados para estimar PC ha sido aproximadamente la mitad de los examinados para PT, puesto que aproximadamente la mitad de los ápices no eran micorrícicos y PC esta calculado sobre ápices micorrícicos. En este caso el resultado de la fórmula (1) sí ha sido satisfactorio, pues la amplitud de los intervalos de confianza disminuye con 100 ápices micorrícicos (correspondientes a 200 ápices totales evaluados).

Posiblemente un conteo de 200 ápices fuera adecuado para estimar las proporciones verdaderas tanto de PC como de PT, pero preferimos recomendar el conteo de 250 ápices para garantizar mayor certeza de las evaluaciones en casos de alta agregación. Además, la diferencia entre el tiempo empleado en contar 200 ápices y el tiempo empleado en contar 250 ápices no llega al 10% del tiempo empleado en evaluar una planta. Por ello concluimos que con un conteo de 250 ápices podemos estimar con una confianza razonable la proporción de ápices micorrizadas con *T. melanosporum* y la proporción de ápices micorrizados con contaminantes en una planta.

Durante el desarrollo de un programa de certificación, sería aconsejable revisar la amplitud de los intervalos de confianza de las diferencias entre las proporciones estimadas a partir de varios tamaños de muestra y, si las distribuciones lo permiten, reducir el número de muestras en una segunda fase.

La experiencia del analista será fundamental para aumentar el rendimiento del proceso. En este método de muestreo hay varios puntos críticos que dependen de la experiencia y profesionalidad del analista: 1) detectar contaminantes y el estado general de colonización, en una primera observación permitirá eliminar plantas que no llegarían a los mínimos exigibles sin invertir tiempo en examinar 250 ápices; 2) cortar el sistema radical en

segmentos sin dañar los ápices para poder identificar su situación micorrícica después; 3) distribuir los segmentos de raíz de forma uniforme y no sesgada sobre la cuadrícula para que la estimación estadística sea válida.

### **Bibliografía**

Bencivenga, M., Donnini, D., Tanfulli, M., and Guiducci, M. 1995. Tecnica di campionamento delle radici e degli radicali per valutazione delle piante micorrizzate. *Mic. Ital.*, 2: 35-47.

Chevalier, G. y Grente, J. 1978. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production a grande echelle de plants mycorrhizes par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Science*, 10: 483-505.

Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Harper Collins Publishers, Inc. New York, NY, EE.UU.

**5ª fase: Determinación del número de plantas que deben ser examinadas en el control de un lote de plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum***

**Introducción:**

La etapa final en el método de control de plantas comercialmente inoculadas con *Tuber melanosporum* es la determinación de cuantas plantas por lote deben ser examinadas para tener una buena estimación del lote. Dado que el examen de la planta es destructivo y representa un coste para el vivero y otro coste para el laboratorio evaluador, es importante minimizar el número de plantas examinadas, sin comprometer la validez de los resultados obtenidos.

El primer método Italiano (Bencivenga 1987) recomendaba evaluar un 3% de las plantas de un lote, con un mínimo de 6 plantas en lotes de menos de 200 plantas y, en el caso de que apareciera una planta de condiciones marcadamente pobres, tomar otra muestra del 6% del lote. En su obra más reciente, los investigadores italianos han concluido que el 1% es suficiente cuando la variabilidad del lote es muy baja (Bencivenga 1995).

El objetivo de este apartado ha sido comprobar los resultados de estos autores y su aplicabilidad a la planta de *Quercus ilex* producida en los viveros españoles.

**Métodos y Resultados**

**Cálculo del número mínimo de plantas necesario para estimar PT y PC.**

Desarrollamos este estudio en tres fases. Primero estimamos la variabilidad de la proporción de *T. melanosporum* ( $PT = T/(N+C)$ ) y la proporción de contaminantes ( $PC = C/T$ ) siguiendo el método descrito en la fase 4, en los dos lotes de plantas (lotes 1 y 2) que sirvieron para estimar el número mínimo de ápices por planta (ver fase 4). Después, una vez conocida la variabilidad en estos lotes, calculamos el número de plantas necesario para estimar PT y PC y lo aplicamos a otros tres lotes para comprobar su validez. Posteriormente hicimos una estimación usando el conjunto de los 5 lotes.

El número de plantas que deben ser analizadas para estimar PT o PC de un lote viene dado por la ecuación (Krebs 1989):

$$n = \left( \frac{t_{\alpha} \cdot s}{d} \right)^2 \quad (1)$$

- n - número de plantas
- s - desviación típica de la variable
- $t_{\alpha}$  - Valor crítico de t
- d - amplitud del intervalo de confianza

Utilizamos 5 puntos porcentuales como amplitud del intervalo de confianza (I.C.) deseado (Bencivenga et al. 1995) alrededor del límite inferior aceptable para PT (PT = 0.5, ver fase 5, Método) y del límite superior aceptable para PC (PC = 0.33 en plantas con PT mínima (PT = 0.5), ver fase 5, Método). Hemos elegido los valores límites de PT y PC porque consideramos que el método propuesto debe tener su mayor precisión alrededor de los límites de admisión de los lotes. Las proporciones fueron transformadas para obtener distribuciones más próximas a la normal. Para PT, la transformación utilizada fue  $t(\text{PT}) = \log(\text{PT})$ . Para PC, la transformación utilizada fue  $t(\text{PC}) = \log(\text{PC}+0.1)$ . La Tabla 1 presenta las conversiones del intervalo de confianza en porcentajes —las unidades usadas por Bencivenga et al. (1995)— a proporciones —las unidades usadas en este estudio— y a logaritmos de proporciones —la escala utilizada en el análisis estadístico.

Fase 4. Muestreo de lotes

Tabla 1. Correspondencia entre la amplitud del intervalo de confianza expresado en porcentajes, proporciones y logaritmo de proporciones.

	porcentaje	proporción	log(proporción)
<b>I.C. de PT</b>			
límite inferior	28.3	28.3/(100-28.3)= 0.39	log(0.38)= -0.4202
valor medio	33.3	33.3/(100-33.3)= 0.50	log(0.5)= -0.3010
límite superior	38.3	38.3/(100-38.3)= 0.62	log(0.62)= -0.2076
<b>amplitud</b>	<b>(38.3-28.3)/2= 5</b>	<b>(0.62-0.39)/2= 0.12</b>	<b>(-0.2-(-0.42))= 0.1063</b>
<b>I.C. de PC</b>			
límite inferior	6	6/(33.3)= 0.18	log(0.18+0.1)= -0.5528
valor medio	11	11/(33.3)= 0.33	log(0.33+0.1)= -0.3665
límite superior	16	16/(33.3)= 0.48	log(0.48+0.1)= -0.2366
<b>amplitud</b>	<b>(16-6)/2= 5</b>	<b>(0.48-0.18)/2= 0.15</b>	<b>(-0.24-(-0.55))= 0.1580</b>

Primera estimación

En primer lugar calculamos el tamaño mínimo de muestra para estimar PT a partir de 10 plantas de cada uno de los lotes 1 y 2.

Para estimar la varianza de PT utilizamos la varianza media de estos dos lotes (Tabla 2)(Steel y Torrie 1980).

$$s^2 = \frac{s_1^2 + s_2^2}{2} = \frac{0.0218 + 0.0224}{2} = 0.022 \quad (2)$$

$s^2$  = varianza media

$s_1^2$  = varianza lote 1

$s_2^2$  = varianza lote 2

Fase 4. Muestreo de lotes

Tabla 2. Medias y varianzas de log(PT) y log(PC+0.1) en los 5 lotes de plantas estudiados.

lote	media log(PT)	media log(PC+0.1)	varianza log(PT)	varianza log(PC+0.1)
1	0.0451	-0.6332	0.0218	0.0506
2	-0.2928	-0.5687	0.0224	0.0729
3	-0.1959	-1	0.0329	0
4	-0.3239	-0.7713	0.0600	0.1401
5	0.02171	-0.9112	0.0071	0.0358
<b>media</b>			0.0288	0.0599

Resolviendo la ecuación (1) para:

$$d = 0.1063 \text{ (de Tabla 1)}$$

$$s = \sqrt{s^2} = 0.149 \text{ (de ecuación (2))}$$

$$t_{0.05, 10} = 2.228$$

$$n = \left( \frac{2.228 \cdot 0.149}{0.106} \right)^2 = 9.8 \text{ plantas}$$

Después calculamos el tamaño mínimo de muestra para estimar PC.

Para estimar la varianza de PC utilizamos la varianza media de estos dos lotes (Tabla 1)(Steel y Torrie 1980).

$$s^2 = \frac{s_1^2 + s_2^2}{2} = \frac{0.0506 + 0.0729}{2} = 0.062 \quad (3)$$

$$s^2 = \text{varianza media}$$

$$s_1^2 = \text{varianza lote 1}$$

$$s_2^2 = \text{varianza lote 2}$$

Resolviendo la ecuación (1) para:

$$d = 0.158 \text{ (de Tabla 1)}$$

$$s = \sqrt{s^2} = 0.249 \text{ (de ecuación (3))}$$

$$t_{0.05, 12} = 2.179$$

$$n = \left( \frac{2.179 \cdot 0.249}{0.158} \right)^2 = 11.8 \text{ plantas}$$

Para estimar PT es necesario estudiar 10 plantas, mientras que para estimar PC son necesarias 12 plantas. Los lotes 1 y 2 no eran lotes comerciales por su alto nivel de contaminantes. Su uso principal fue el entrenamiento de un analista en la observación de contaminantes. Por ello consideramos que su varianza sería más alta que la de los lotes que los viveristas enviarían para su control y decidimos utilizar un tamaño de muestra de 10 plantas tanto para PT como para PC.

Validación de la estimación

Tomamos una muestra de 10 plantas de otros tres lotes para comprobar la validez de los resultados obtenidos en la estimación anterior. Los resultados de este estudio están recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Amplitud de los intervalos de confianza de log(PT) y log(PC+0.1) estimados a partir de una muestra de 10 plantas en los lotes 3, 4 y 5.

Lote	I.C. log(PT)	I.C. log(PC+0.1)	Amplitud I.C. log(PT)	Amplitud I.C. log(PC+0.1)
3	-0.323, -0.068	-1, -1	0.128	0
4	-0.496, -0.151	-1.035, -0.507	0.173	0.264
5	-0.038, 0.081	-1.044, -0.778	0.059	0.133
Amplitud media			0.12	0.11
Amplitud deseada (Tabla 1)			.12	.15

La amplitud media de los intervalos de confianza para log(PT) ha sido igual a la máxima tolerada, pero en dos de los lotes ha sido superior. Para estos dos lotes, el número de muestras no ha sido suficiente para obtener un intervalo de confianza de la amplitud deseada (Tabla 1). En cambio para el último lote, mucho más homogéneo, hubiera bastado con 3 plantas para obtener el intervalo de confianza deseado.

El tamaño de muestra de 10 plantas ha sido suficiente para PC. La amplitud media del intervalo de confianza de log(PC+0.1) ha sido inferior a la



deseada. Dos de los tres lotes han presentado amplitud de I.C. menor que la máxima prevista y uno, superior.

En vista de estos resultados hemos estimado el tamaño mínimo de muestra a partir de todos los lotes, utilizando la varianza media de los 5 lotes. Los resultados están recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Tamaño de muestra para log(PT) y log(PC+0.1) estimado a partir de los 5 lotes.

	Varianza	Amplitud I.C.	Num plantas
log(PT)	0.0288	0.106	12.1
log(PC+0.1)	0.0599	0.158	11.6

Según este análisis es necesario evaluar 12 muestras para estimar PT y PC con la amplitud de I.C. mencionada en lotes de variabilidad similar a la de los nuestros.

**Cálculo del número mínimo de plantas necesario para estimar la calidad de planta del lote.**

Las variables de calidad de planta son cualitativas. Así una planta puede estar sana o no. Siguiendo el criterio de Peñuelas (1995), un lote de plantas en el que más de un 5% (I.C. = 0, 0.15) de plantas no cumplan los criterios de calidad de planta no debería ser admitido. Para una muestra de 12 plantas sólo es posible aceptar el lote si todas las plantas cumplen los criterios. Si al menos una planta no los cumpliera, el intervalo de confianza del 95% sería: I.C. = 0.002, 0.37 (Steel y Torrie 1980).

Si en el proceso de evaluación aparece una planta rechazada por motivos de calidad de planta en la primera observación (ver fase 4), sería preciso obtener una muestra mucho mayor para obtener un intervalo de confianza más reducido.

El tamaño de la muestra necesaria viene dado por la ecuación (Krebs 1989):

$$n = \frac{t_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{d^2} \tag{4}$$

- n - número de plantas
- p - porcentaje de plantas rechazadas.
- q - (1-p)

$t_{\alpha}$  - Valor crítico de t  
d - amplitud del intervalo de confianza

Resolviendo la ecuación (4) para los parámetros recomendados por Peñuelas (1995):

$$\begin{aligned}d &= (0.15-0)/2 = 0.075 \\p &= 0.15 \text{ (límite superior del intervalo de confianza)} \\ \alpha &= 0.05\end{aligned}$$

obtenemos un tamaño de muestra de:

$$n = (1.987^2 \cdot 0.15 \cdot 0.85) / 0.075^2 = 90$$

El resultado de esta ecuación debe ser tomado teniendo en consideración que estamos tratando con una variable binomial cuya varianza es función de la media. Por ejemplo, para una muestra sin ninguna planta rechazada, con un tamaño de muestra de 23 sería suficiente para obtener un I.C. de amplitud menor de 0.075. En cambio para una muestra con el 50% de plantas rechazadas serían necesarias 200 plantas para obtener un intervalo de confianza de la misma amplitud.

Sería recomendable hacer un muestreo secuencial en el que el analista compute el intervalo de confianza cada 5 ó 10 plantas a partir de la vigésima tercera que sería la primera para la que la amplitud del intervalo de confianza sería menor del deseado, suponiendo que ninguna planta sea rechazada. De esta manera, el lote podría ser aceptado si el límite superior del I.C. no superase el límite establecido antes de llegar a las 90 plantas, o podría ser rechazado si el límite inferior del I.C. superase el valor de referencia (5%) aunque no se haya llegado a las 90 plantas.

Por ejemplo, una muestra en la que al llegar a la planta 50 se hubieran rechazado 2 plantas, se podría admitir (I.C.: 0.05, 0.14), y una muestra en la que al llegar a la planta 10 se hubieran rechazado 3 plantas, no se podría admitir (I.C.: 0.06, 0.65).

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 (Steel y Torrie 1980).

## **Discusión**

Tres de estos cinco lotes han sido producidos por viveros aún incipientes. Eso puede explicar su alta variabilidad. A medida que el sector se estabilice será más fácil encontrar lotes de variabilidad más parecida a la del lote 5.

En un muestreo secuencial, no será preciso analizar las 12 plantas si con un número de plantas inferior se cumplen los criterios prefijados.

El método italiano (Bencivenga et al. 1987 y 1995) recomienda un tamaño de muestra en función del tamaño del lote. De esta manera, la amplitud de los intervalos de confianza obtenidos dependerá del tamaño del lote. Así, en los lotes pequeños la precisión de la estimación puede ser demasiado baja, mientras en los lotes grandes se incurrirá en un gasto superfluo obteniendo una precisión superior a la necesaria. Para mantener la precisión constante, el número de plantas examinadas debe mantenerse constante. La muestra no deja de ser representativa de la población de la que proviene cuando el tamaño de la población aumenta. El único requisito para que una muestra de doce plantas sea representativa del lote del que proviene es que las plantas hayan sido seleccionadas de forma absolutamente aleatoria. El tamaño de la muestra necesaria para obtener un I.C. de determinada amplitud sí depende de la variabilidad del lote del que es extraída. Por eso es recomendable analizar un número de muestras inferior en lotes de menor heterogeneidad.

El tamaño de muestra recomendado está basado en las amplitudes de los intervalos de confianza recomendadas por los investigadores italianos (Bencivenga, com. pers.) debido a la carencia de datos experimentales en España. Sería necesario corroborarlos mediante experimentos en el campo, donde se pudiera estudiar el establecimiento y permanencia de la ectomicorriza y la posterior fructificación de *T. melanosporum* en función de la proporción de ectomicorrizas de *T. melanosporum* (PT) y la proporción de contaminantes (PC) presentes en los lotes en el momento de ser plantados. Estos datos nos permitirían ajustar la amplitud de los intervalos de confianza a las necesidades reales de los cultivadores.

## **Bibliografía**

Bencivenga, M., Donnini, D., Tanfulli, M., and Guiducci, M. 1995. Tecnica di campionamento delle radici e degli radicali per valutazione delle piante micorrizate. *Mic. Ital.*, 2: 35-47.

#### Fase 4. Muestreo de lotes

- Bencivenga, M., Ferrara, A.M., Fontana, A., Granetti, B., Gregorio, G., Lo Bue, G., Palenzona, M., Rebaudengo, E., Tocci, A. y A. Zambonelli. 1987. Valutazione dello stato di micorrizazione in piantine tartufigene. Min. Agr. For.
- Chevalier, G. y Grente, J. 1978. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production à grande échelle de plants mycorrhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). Mushroom Science, **10**: 483-505.
- Krebs, C.J. 1989. Ecological Methodology. Harper Collins Publishers, Inc. New York, NY, EE.UU.
- Peñuelas Rubira, J. 1995. Calidad de la planta forestal: normativa y control. Ponencia presentada en las Jornadas sobre nuevas técnicas de producción de planta forestal. Junta de Castilla y León, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Dirección General del Medio Rural. Molinos de Duero, Soria. 7-10 Octubre de 1995.
- Steel, R. y J. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Publishing Company. New York, NY, EE.UU.

**Informe del viaje al Institut für Systematische Botanik der Universität München, Section Mykologie. Menzingerstr. 67, D-80638 Munich.**

**13-24 de Noviembre de 1995. Christine Fischer**

El objetivo de este viaje fue mejorar las técnicas para describir ectomicorrizas con el Profesor Reinhard Agerer, editor e investigador principal del Colour Atlas of Ectomycorrhizae (1987-95), obra de referencia en la materia. Durante las dos semanas, trabajé en su laboratorio con plantas de *Quercus ilex* inoculadas con diferentes hongos de viveros españoles, incluida *Q. ilex* inoculada con *Tuber brumale* en Valonsadero. Con la supervisión del Prof. Agerer estudié con mucho detalle las fichas macroscópicas y microscópicas en su método de descripción: Checklists A, B, C1 y C2 (Agerer 1987-95). El Prof. Agerer me recomendó las técnicas más apropiadas para observar detalles importantes en los diferentes niveles de los mantos y me ofreció sus sugerencias sobre nuestro trabajo.

**Lavado**

La primera técnica para empezar con la descripción es el método de limpiar las raíces. En el I.S.B. hacen mucho hincapié en los detalles del lavado, porque sin material bien preparado, se pierden ápices, rizomorfos, cristales y caracteres en la superficie del manto. Con su método, las raíces se lavan en agua fría, con movimientos suaves sin presión de agua corriente. El agua se cambia muchas veces hasta que se haya eliminado la mayoría del sustrato. El sustrato que queda adherido a la raíz se quita con pinzas al microscopio estereoscópico.

**Preparación de ápices para el microscopio**

El uso de la preparación aplastada de ápices para examinar las ectomicorrizas ha sido una preparación rápida y muy común (Ingleby 1990). La raíz se coloca en el portaobjetos en tinciones para distinguir tejido de hongo (azul de algodón o azul de toluidina), o en KOH para disolver las células de la planta y así facilitar la observación de la ectomicorriza. La raíz se aplasta debajo del cubre objetos y se examina al microscopio en campo claro. Esta técnica de preparación aplastada tiene la ventaja de ser muy rápida pero tiene muchas limitaciones cuando la ectomicorriza tiene un manto grueso y con distintas organizaciones entre la parte superficial y la interior, mas cerca de la Red de Hartig. Además el KOH causa cambios de color distintos en diferentes

especies del árbol que pueden interferir con la observación del color verdadero de la ectomicorriza. Por ejemplo, KOH con raíces de *Quercus ilex* causa una reacción roja, muy rápida y brillante.

Una solución para mejorar las observaciones es la preparación de secciones longitudinales en un corte muy fino hecho con una aguja. Con estas secciones finas, las hifas del manto son más visibles y no sufren desplazamientos ni interferencias con tejidos de la raíz. El KOH no es necesario y la sección del manto se puede observar fresca en agua. Además, el uso del microscopio Nomarski para observar las preparaciones de secciones longitudinales permiten la observación de un único plano.

### **Discusiones sobre *Tuber***

El equipo del I.S.B. ha descrito 3 micorrizas de *Tuber* recientemente. Esto me ha proporcionado la oportunidad de discutir los caracteres más representativos de las micorrizas de *Tuber* con ellos. Un tema particularmente importante es el de las descripciones de los cistidios, las espínulas y las hifas externas del manto. En su estudio de *T. melanosporum* en *Corylus avellana*, no observó hifas externas del manto. En nuestro estudio de plantas de *Q. ilex* inoculadas con *T. melanosporum*, se observan hifas externas del manto y una abundancia de espínulas. En su opinión, con observaciones de las tres especies de *Tuber*, la frecuencia de hifas externas del manto y cistidios puede ser debida a la composición y las condiciones de la humedad del sustrato.

El Prof. Agerer está interesado en colaboraciones con las descripciones de *Tuber brumale* y *Tuber indicum*. Un problema difícil en las descripciones de estas ectomicorrizas es la presencia de hifas contaminantes que se pueden encontrar en suelos truferos o en sustratos no estériles. Todavía no ha sido publicada una buena descripción de la ectomicorriza de *Tuber indicum*. Gracias a la colaboración establecida con el grupo del Prof. Agerer disponemos de una descripción de la superficie del manto, del manto interior y de las hifas externas del manto que observamos en nuestros ensayos (ver Libro de Fotos, Fase 5).

Al finalizar la visita, el Prof. Agerer me ofreció su asistencia cuando nos surjan problemas en el trabajo en Valonsadero y puso a nuestra disposición una copia de sus nuevas descripciones y clave de micorrizas de *Tuber* en *Quercus* en proceso de publicación, que hemos podido utilizar desde tres meses antes de su distribución.

## **Bibliografía**

- Agerer, R. (ed.). 1987-95. Colour Atlas of Ectomicorrhizae, 1st-9th delivery. Einhorn-Verlag, Schwabisch Gmund.
- Ingleby, K.; Mason P.A.; Last, F.T. y L.V. Fleming. 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE research publication no. 5. HMSO, London.

## **5ª fase: Método de control de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum***

### **Introducción:**

El proceso de certificación de plantas inoculadas con diferentes especies de *Tuber* ha sido desarrollado desde 1979 en Francia e Italia (Chevalier y Grente 1978; Bencivenga et al. 1987), con cambios más recientes en el método Italiano (Bencivenga et al. 1995a). Con el creciente interés en truficultura en España apoyado en parte por las subvenciones para repoblaciones de tierras agrícolas marginales, ha comenzado a desarrollarse en nuestro país una industria de producción de planta autóctona, inoculada con *Tuber melanosporum*.

Los viveristas franceses disponen de un servicio de certificación del INRA que proporciona a sus clientes la garantía de que las plantas están bien inoculadas. Los viveristas españoles productores de planta micorrizada no disponen de este servicio y se ven obligados a vender planta de la misma calidad que la francesa a precios inferiores. La aplicación del método de control que proponemos permitiría a nuestros viveristas proporcionar a los agricultores una planta autóctona garantizada y competir en igualdad de condiciones con los demás viveristas europeos.

### **Procedimiento de control**

#### **Identificación del lote**

El control de plantas empieza con el examen de los documentos de identificación de un lote homogéneo de plantas que incluye la procedencia de la bellota y el pasaporte fitosanitario establecido y regulado por la Orden Ministerial de 17 de mayo de 1993 (Peñuelas 1995). Estos documentos también deben incluir la fecha de siembra y la fecha de inoculación con *Tuber melanosporum*.

Un lote homogéneo significa que todas las plantas tienen idénticos a) procedencia de bellota, b) lote de inóculo, c) proceso y fecha de inoculación, d) sustrato y d) régimen de riego. No importa la diferente altura de las plantas, porque en nuestro caso, la homogeneidad del sistema radicular es lo más importante, y la variabilidad de alturas de *Q. ilex* depende más del rango genético disponible dentro de una procedencia. Cuando el lote de plantas ha



sido correctamente identificado, el analista puede proceder a la toma de muestras para su estudio en el laboratorio.

### Toma de muestras

La fase de muestreo del lote es posiblemente la más crítica, pues en su aleatoriedad se basa toda la información que obtendremos del análisis de la muestra.

El agente de control debe desplazarse al vivero y tomar una muestra de 12 plantas (ver fase 5) de forma absolutamente aleatoria sirviéndose de una tabla de números aleatorios o de cualquier otro método que garantice la ausencia de cualquier tipo de sesgo a la hora de tomar la muestra.

Las plantas deben transportarse en una nevera portátil y una vez en el laboratorio deben guardarse en cámara fría a 4°C. El agente de control debe documentar la fecha del muestreo y las condiciones de transporte y almacenamiento. Si encontramos problemas de desecación o pudriciones en las plantas, será importante disponer de datos que permitan estimar si los problemas han ocurrido antes o después de la salida de las plantas del vivero.

La evaluación de las plantas debe hacerse en el plazo de dos semanas a partir de la toma de muestras en el vivero.

### Procedimiento de lavado

El analista debe sacar las plantas de los contenedores cuidadosamente con el cepellón entero y sumergirlas en un baño de agua para empapar el sustrato. Después, 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. Los restos de sustrato que quedan adheridos a las raíces se pueden eliminar con pinzas finas bajo el microscopio estereoscópico durante la primera observación. Las plantas no deben permanecer en agua más de 24 horas antes de proceder a su examen al microscopio.

### Evaluación de calidad de planta

Consideramos fundamental que la calidad de planta sea el primer criterio para el control. En las Normas Cualitativas de CEE (aún pendientes en

España), las partidas estarán formadas por, al menos, un 95% de plantas de calidad comercial (Peñuelas 1993b, 1995).

El primer paso en el examen de cada planta es la evaluación de su calidad. Los criterios de calidad de planta (definidos en el apéndice 1) están basados en las ideas propuestas por Peñuelas (1993b, 1995). Las plantas que no cumplan todos los criterios de calidad, pueden ser excluidas del proceso laborioso de conteo de ápices.

El analista deberá documentar en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2) los resultados de la evaluación de calidad de planta rellenando cada casilla con un "1" si la planta cumple el criterio y con un "0" si no lo cumple.

#### 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. El analista examinará el sistema radical desde el cuello de la planta hasta los ápices más distales, observando la abundancia de raíces tróficas, el estado micorrícico, la presencia, desarrollo y apariencia general de las micorrizas de *T. melanosporum*, y la presencia de contaminantes (entendemos como contaminantes las micorrizas de hongos distintos de *T. melanosporum*). En esta etapa el analista tiene que examinar al microscopio óptico los ápices cuyo estado micorrícico sea incierto para facilitar el conteo posterior.

Si se encuentran ápices micorrizados con una especie de *Tuber* distinta de *T. melanosporum* el lote deberá ser rechazado. El analista tiene la responsabilidad de verificar cuidadosamente la identidad del hongo y obtener asistencia exterior si fuera preciso para verificar la identidad de la micorriza antes de rechazar todo un lote. El analista deberá documentar estos casos para hacer en el futuro un seguimiento del vivero donde se ha encontrado el contaminante.

Los demás criterios que deben cumplir las plantas en esta fase son:

- a) abundantes raíces tróficas, claramente suficientes para contar un mínimo de 250 ápices;
- b) porcentaje de micorrización no claramente inferior al 10%;

- c) porcentaje de micorrizas contaminantes no claramente superior al 50%.

Los resultados de la primera observación al microscopio estereoscópico deben ser documentados en la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2) rellenando cada casilla con un "1" si la planta cumple el criterio y con un "0" si no lo cumple.

Las plantas que no cumplan estos criterios pueden ser excluidas del proceso laborioso de conteo de ápices.

### Conteo de ápices

El análisis de las plantas que cumplen los criterios de calidad y los de la primera observación, continúa con el conteo de ápices para determinar 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.
- 2) Colocar la mitad del sistema radical en la bandeja de análisis.
- 3) Cortar el sistema radical en segmentos de 2-3 cm evitando romper ápices.
- 4) Separar los segmentos y distribuirlos homogéneamente por toda la superficie de la bandeja evitando romper ápices

La bandeja de análisis tendrá agua hasta una profundidad de 2 a 3 cm y dispondrá de una cuadrícula en el fondo de 1 cm. x 1 cm. La cuadrícula estará marcada con cuadros de 4 colores diferentes distribuidos de forma aleatoria para permitir un muestreo al azar de todo el sistema radical (Apéndice 5).

- 5) Elegir aleatoriamente uno de los colores de los cuadros de la cuadrícula.
- 6) Localizar el primer cuadro del color seleccionado empezando por el extremo superior izquierdo de la cuadrícula.
- 7) Observar los ápices que están dentro del cuadro y los que están sobre las líneas superior e izquierda del cuadro.

- 8) Contar el número de ápices, observados en el cuadro, pertenecientes a cada una de las 3 categorías: "Micorrizado con *T. melanosporum*", "Micorrizado con un contaminante" o "No micorrizado" (los ápices senescentes se incluirán en la categoría de "No micorrizado") y anotar estos 3 números en la casilla correspondiente de la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2).
- 9) Desplazar el campo de visión del microscopio estereoscópico siguiendo la cuadrícula hacia la derecha hasta encontrar el siguiente cuadro del mismo color. Si no hubiera más cuadros del mismo color en la fila, bajaríamos a la fila inferior barriéndola de derecha a izquierda.
- 9) Repetir 7, 8 y 9 hasta haber observado 250 ápices. Si al terminar los cuadros de un color no se ha llegado a 250 ápices, seleccionaríamos también aleatoriamente otro color y volveríamos al punto 6. Si después de observar todos los cuadros no se hubiera llegado a 250 ápices repetiríamos el proceso desde el punto 2 con la otra mitad del sistema radical.

#### Determinación de las proporciones de cada planta

Las proporciones se calcularán a partir del número de ápices en cada categoría después de haber examinado 250 ápices. El cálculo es sencillo y se podrá hacer fácilmente con una calculadora en el laboratorio después de examinar cada planta. Así, el analista tendrá la oportunidad de verificar los totales y descansar los ojos del microscopio.

Los cálculos son los siguientes:

- 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

Después de hacer los cálculos para cada planta, y completar la Hoja de Datos de Planta (Apéndice 2), el analista debe introducir los datos de la planta en la Hoja de Datos de Lote (Apéndice 3) de la forma siguiente:

Planta: Número correlativo de la planta dentro de la muestra del lote;

Calidad planta: 1 si la planta cumple todos los criterios; 0 si no cumple algún criterio;

1ª Observ.: 1 si la planta cumple todos los criterios; 0 si no cumple algún criterio;

PT: Valor de PT de la planta;

PC: Valor de PC de la planta.

La decisión de admitir o rechazar un lote se tomará en función de si las plantas cumplen los criterios de: 1) calidad de planta, 2) de la primera observación y 3) de los intervalos de confianza de PT y PC . El intervalo de confianza se computará con la siguiente fórmula (Steel y Torrie 1980):

$$\text{Lim. inf.} = \bar{x} + t_{\alpha, n-1} \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

$$\text{Lim. sup.} = \bar{x} - t_{\alpha, n-1} \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

$\bar{x}$  = media

$t_{\alpha, n-1}$  = t para un nivel de sig.  $\alpha$  y  $n - 1$  grados de libertad

$s^2$  = varianza

$n$  = número de plantas

Sugerimos que el muestreo se lleve a cabo de forma secuencial. Así, el analista computará los intervalos de confianza cada vez que añade los datos de una nueva planta a la Hoja de Datos de Planta a partir de la quinta. Si el lote es homogéneo y de alta calidad, los límites inferiores de PT y superiores de PC pueden indicar claramente que el lote cumple los requisitos deseados y, si las plantas cumplen los demás criterios, se podrá admitir el lote sin examinar más plantas. Este cálculo se puede automatizar sencillamente en una hoja de cálculo informática (Apéndice 6). Si los I.C. calculados con 5

plantas no cumplen los criterios, el analista debe continuar analizando plantas hasta que se cumplan los criterios o hasta llegar a las 12 plantas.

Este muestreo secuencial del lote para estimar los I.C. de PT y PC permite una rápida evaluación de lotes homogéneos y de buena calidad. La necesidad de evaluar muestras completas de 12 plantas es consecuencia de una heterogeneidad de los lotes que pensamos que irá disminuyendo a medida que el sector viverista se vaya desarrollando.

### Criterio de control

El lote será admitido cuando se cumplan los siguientes criterios:

- a) No debe haber ninguna planta que no haya cumplido los criterios de calidad.
- b) No debe haber ninguna planta que no haya cumplido los criterios de la primera observación.
- c) No debe haber ninguna planta que tenga una PT menor de 0.11 (10%).
- d) No debe haber ninguna planta que tenga una PC mayor de 0.50 (50%).
- e) El límite inferior del I.C. de PT debe ser mayor de 0.50.
- f) El límite superior del I.C. de PC debe ser menor de 0.33.
- g) No debe haber ninguna planta con micorrizas identificadas de una especie de *Tuber* distinta de *T. melanosporum*.

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 ó 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 inadmisibile en una muestra de tan solo 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 (ver fase 5). 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 es el siguiente:

### Identificación del lote

Id. primera evaluación.

### Toma de muestras

Id. primera evaluación. El tamaño de la muestra será de 90 plantas (ver fase 5).

### Evaluación de calidad de planta

Id. primera evaluación.

### Primera observación al microscopio estereoscópico

Id. primera evaluación.

### Determinación del I.C. del número de plantas que no cumplen los criterios de calidad de planta o de la primera observación

Después de verificar cada planta para ver si cumple los criterios, el analista debe introducir los datos de la planta en la Hoja de Datos de Segunda Evaluación (Apéndice 4) de la forma siguiente:

Planta: Número correlativo de la planta dentro de la muestra del lote;

Calidad planta: 1 si la planta cumple todos los criterios; 0 si no cumple algún criterio;

1ª Observ.: 1 si la planta cumple todos los criterios; 0 si no cumple algún criterio.

Sería recomendable hacer un muestreo secuencial en el que el analista obtenga el intervalo de confianza cada 5 ó 10 plantas a partir de la vigésima tercera que sería la primera para la que la amplitud del intervalo de confianza sería menor del deseado (0.075, ver fase 5), suponiendo que ninguna planta sea rechazada.

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 (Steel y Torrie 1980).

De esta manera, el lote podría ser aceptado o rechazado aunque no se haya llegado a las 90 plantas.

#### Criterio de control

El lote será admitido cuando se cumplan los dos criterios siguientes:

- a) El límite superior del I.C. del número de plantas que no cumplen los criterios de calidad de planta o de la primera observación no supera el límite establecido (5%).
- b) No debe haber ninguna planta con micorrizas identificadas de una especie de *Tuber* distinta de *T. melanosporum*.

El lote será rechazado cuando se cumpla alguno de los dos siguientes criterios:

- a) El límite inferior del I.C. del número de plantas que no cumplen los criterios de calidad de planta o de la primera observación supera el límite establecido (5%).
- b) alguna planta tiene micorrizas identificadas de una especie de *Tuber* distinta de *T. melanosporum*.

Si se cumplen las condiciones de aceptación o rechazo antes de haber analizado las 90 plantas, no es necesario continuar. Se puede aceptar o rechazar el lote sin dedicarle más esfuerzo.



## Discusión

### Documentación

La documentación de identificación de los lotes, procedencia de bellotas y pasaporte fitosanitario son importantes para registrar los resultados, comunicarse con el viverista, y mantener una base de datos que en el futuro permita hacer un seguimiento del comportamiento en campo de la planta evaluada.

### Calidad de planta

La calidad de planta es particularmente importante cuando el árbol tiene que crecer sano durante 10 ó 12 años antes de empezar a producir un rendimiento. Aún no existe en España una ley que recoja los criterios de calidad de planta de *Quercus ilex* o de planta en contenedor. *Quercus ilex* está considerado como un árbol para repoblación en sitios sin mucha atención. Se suele cultivar en contenedores pequeños para plantar con una savia, y los criterios de calidad no son muy específicos. Por ello incorporamos las normas propuestas por Peñuelas (1995) que proporcionan una guía racional y concreta para evaluar planta forestal. En los métodos francés (Chevalier y Grente 1978) e italiano (Bencivenga et al. 1987) las plantas también deben cumplir los requisitos fitosanitarios antes de ser evaluada su micorrización.

Uno de los problemas más serios encontrados es la deformación de la raíz pivotante. Creemos que este problema puede deberse a un contenedor de tamaño insuficiente para la planta que necesita una savia o más para un buen desarrollo de las micorrizas, o a una mala posición de la bellota al semillar los contenedores (Apéndice 2). Este tipo de deformación no es siempre fatal, pero debilita al árbol (Peñuelas, 1993a) y puede favorecer la degeneración de las raíces micorrizadas dificultando así la expansión de *T. melanosporum*. Por ello, no podemos admitir plantas con la raíz pivotante con bucles o ángulos inferiores a  $110^\circ$  y el analista no debe dedicar tiempo a contar los ápices de una planta con estas características. Pero tiene la responsabilidad de documentar la razón de rechazo.

Los otros criterios de altura proporcionada al cepellón, el cuello de suficiente diámetro (2-3 mm), ausencia de raíces ascendentes, buena distribución de raíces secundarias y tróficas, sanidad y endurecimiento de la

planta no presenten grandes problemas si el contenedor es adecuado y no hay compactación del sustrato o enfermedades en el vivero.

Las plantas cultivadas en sistema Melfert o en otros sistemas en los que parte o la totalidad del contenedor se introduce en la tierra junto con la planta no pueden ser admitidas (Peñuelas 1993b). En nuestras observaciones del sistema Melfert en Castilla y León y Cataluña (Fischer, datos no publicados), el tejido que recubre el sustrato tarda más de un año en descomponerse y frena la proliferación de raíces.

### La primera observación

La primera observación de la planta entera al microscopio estereoscópico es un paso importante para eliminar plantas con raíces secas o senescentes o que no tienen raíces tróficas suficientes como para contar un mínimo de 250. También, es importante para eliminar plantas con micorrización demasiado baja, o con altos niveles de contaminantes. Si las plantas tienen buena salud pero tienen pocas raíces tróficas y hace menos de 6 meses que fueron inoculadas sería recomendable volver a evaluar el lote 6 meses más tarde en vez de rechazarlo. En nuestra experiencia, el nivel de desarrollo de las micorrizas es un factor bastante homogéneo dentro de un lote.

La experiencia del analista es muy importante en esta etapa. Es una etapa que incorpora la filosofía del método francés que prima la capacidad de un experto para eliminar plantas que nunca cumplirían los criterios de control sin necesidad de examinar 250 ápices. Durante la primera observación el analista puede fijarse en el rango de colores y morfologías, la presencia de espínulas, el nivel de desarrollo y el aspecto general de las micorrizas de *T. melanosporum*. Además el analista tiene la oportunidad de observar posibles contaminantes y comprobar su identidad al microscopio óptico. Esta información facilitará posteriormente el conteo de ápices individuales.

### El conteo de ápices

En la preparación de la muestra en la cuadrícula, el analista tiene que cortar las raíces cuidadosamente para minimizar el daño a los ápices. La decisión de cortar el sistema radicular a la mitad o en cuartos depende de su tamaño y será la responsabilidad del analista. En el conteo de ápices, consideramos un ápice a cada punta sin ramificación. En los casos de los glomérulos (grupos de raíces finas y tróficas con ramificaciones múltiples en

forma de racimo) contamos cada glómulo como 15 ápices de acuerdo con el método italiano (Bencivenga 1995a).

### Confidencialidad

Los resultados de la evaluación de un lote de plantas deben pertenecer exclusivamente al viverista productor del lote. El laboratorio controlador debe mantener la más absoluta confidencialidad de los resultados para prevenir los desastrosos efectos que podría tener sobre un vivero incipiente la filtración de información sobre un mal lote. La información que guarde el laboratorio para autoevaluación y para pruebas de campo deberá quedar codificada para mantener la confidencialidad de los viveros.

### Criterios de control

Los criterios propuestos en este método están basados en nuestras observaciones y en los propuestos en Italia. En este país, una planta debe tener mas del 30% de micorrización con el hongo inoculado y la diferencia entre el porcentaje de micorrizas de *Tuber* y el porcentaje de micorrizas de contaminantes tiene que ser mayor del 20% (Bencivenga, comunicación personal). Estos criterios pueden ser cumplidos con holgura por los viveros españoles que producen planta con un 30-50% de micorrizas de *T. melanosporum* y menos de un 5% de micorrizas contaminantes.

Hemos preferido utilizar un sistema de proporciones a un sistema de porcentajes (ver fase 4) por su capacidad para reflejar mejor la condición de una planta. En el sistema italiano, tanto una planta con un 30% de *Tuber* y un 10% de contaminantes como otra con un 60% de *Tuber* y un 40% de contaminantes cumplirían el criterio de 20% de diferencia entre *Tuber* y contaminantes siendo plantas muy distintas. En un sistema de proporciones estaría más claro que en la primera planta hay 3 micorrizas de *Tuber* por cada micorriza de contaminantes mientras que en la segunda sólo hay 1.5 micorrizas de *Tuber* por cada micorriza de contaminantes.

Para *T. melanosporum* nosotros hemos elegido una proporción mínima de micorrizas de 0.5 (33% en porcentaje) para admitir un lote.

En cuanto a contaminantes recomendamos admitir una proporción de contaminantes (PC) máxima de 0.33.

Este límite coincide con el criterio italiano en mantener un diferencial de 20 puntos porcentuales entre *Tuber* y contaminantes, pero limita la introducción de contaminantes en las plantaciones al no admitir plantas con más de un 25% de sus raíces colonizadas por contaminantes independientemente de la abundancia de *Tuber* en sus raíces.

Con la información disponible hasta la fecha, no podemos definir cuál es el nivel de micorrización suficiente para unas condiciones de plantación dadas, o qué niveles de qué contaminantes aumentan los riesgos de desplazamiento. La investigación sobre este tema sugiere que *Sphaerosporella brunnea*, un contaminante frecuente de viveros de *Tuber*, puede ser muy agresivo en las condiciones del invernadero (Zambonelli y Govi 1991; Meotto y Carraturo 1987-88), particularmente con sustratos de turba vaporizada (Danielson 1984), pero Bencivenga et al. (1995b) consideran que aunque este ascomiceto es muy competitivo en el invernadero, no presenta un alto peligro en el campo. En cambio, en sus estudios sobre las ectomicorrizas competidoras, han encontrados 3 distintos tipos en vivero que pueden sobrevivir en el campo y posiblemente desplazar la ectomicorriza de *T. melanosporum*. En nuestro caso, carecemos de los resultados de investigación básica necesarios para tomar decisiones basadas en nuestros sistemas. Por ello, y ante la similitud de las condiciones ambientales, hemos decidido adaptar los criterios de valoración italianos.

Idealmente, necesitaríamos pruebas en el campo para decidir estos criterios de evaluación. En su defecto, el organismo evaluador debería establecer parcelas donde se plantaran sistemáticamente plantas de lotes evaluados con diferentes niveles de calidad de planta, colonización con *T. melanosporum* y diferentes niveles y especies de contaminantes. Estas pruebas permitirían evaluar los criterios propuestos en este trabajo y realizar las modificaciones necesarias en base a datos experimentales.

Últimamente, el control de plantas inoculadas con *T. melanosporum* no garantiza que las plantas producirán trufas dentro de 10 ó 15 años. Esto depende de las prácticas de cultivo y de las condiciones en el campo. Pero es seguro que el éxito es imposible sin partir de plantas sanas y bien micorrizadas.

## Bibliografía

- Bencivenga, M., Di Massimo, G., Donnini, D. y M. Tanfulli. 1995b. Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene: Nota 1-Inquinanti in vivaio. *Mic. Ital.* **2**: 167-178.
- Bencivenga, M., Donnini, D., Tanfulli, M., and Guiducci, M. 1995a. Tecnica di campionamento delle radici e degli radicali per valutazione delle piante micorrizzate. *Mic. Ital.*, **2**: 35-47.
- Bencivenga, M., Ferrara, A.M., Fontana, A., Granetti, B., Gregorio, G., Lo Bue, G., Palenzona, M., Rebaudengo, E., Tocci, A. y A. Zambonelli. 1987. Valutazione dello stato di micorrizzazione in piantine tartufigene. *Min. Agr. For.*
- Chevalier, G. y Grente, J. 1978. Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production à grande échelle de plants mycorrhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Science*, **10**: 483-505.
- Danielson, R.M. 1984. Ectomycorrhiza formation by the operculate discomycete *Sphaerospora brunnea* (Pezizales). *Mycologia* **76** (3): 456-461.
- Meotto, F. y P. Carraturo. 1987-88. Ectomicorrizia di *Sphaerospora brunnea* (A.&S.) Svrcek & Kubicka in piantine tartufigene. *Allionia* **28**:109-116.
- Peñuelas Rubira, J. 1993a. El cultivo de la planta forestal en España. *Montes*, **31**: 55-60.
- Peñuelas Rubira, J. 1993b. Calidad de la planta forestal para el plan de reforestación de tierras agrícolas. *Montes*, **33**: 84-97.
- Peñuelas Rubira, J. 1995. Calidad de la planta forestal: normativa y control. Ponencia presentada en las Jornadas sobre nuevas técnicas de producción de planta forestal. Junta de Castilla y León, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Dirección General del Medio Rural. Molinos de Duero, Soria. 7-10 Octubre de 1995.
- Steel, R. y J. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Publishing Company. New York, NY, EE.UU.
- Zambonelli, A. y G. Govi. 1991. Competizione fra *Tuber albidum* ed altri funghi: 3° contributo. *Mic. Ital.* **3**: 15-12.

**Apéndices**

## Apéndice 1.

### Criterios de calidad de planta.

#### **Criterio de evaluación de calidad de planta para *Quercus ilex* en contenedor.**

Las plantas deberán cumplir todos los requisitos siguientes:

- 1) La altura de la parte aérea no puede superar el doble de la longitud del cepellón.
- 2) El diámetro de cuello debe tener más de 2 ó 3 mm (para plantas de 1 ó 2 años, respectivamente).
- 3) La raíz pivotante debe estar bien repicada sin bucles o ángulos inferiores a 110°.
- 4) No debe tener raíces secundarias ascendentes.
- 5) Debe tener raíces secundarias a lo largo de la raíz pivotante, con una abundancia de raíces tróficas.
- 6) La planta debe estar sana tanto en la parte aérea como en la parte radicular sin pudriciones ni desecación.
- 7) La planta debe haber pasado un periodo de endurecimiento y tener el cuello lignificado.

## Apéndice 2. Hoja de datos de planta

Evaluación de plantas de <i>Quercus ilex</i> inoculadas con <i>Tuber melanosporum</i>							
Planta N°:		Vivero:		Fecha de siembra:			
Fecha:		Lote:		Fecha de inoculación:			
Calidad de planta						Comentario	
Altura	Ø Cuello	Raíz pivotante	Raíces ascendentes	Distrib. raíces secundarias	Sanidad		Endurecimiento
Primera Observación			Comentario				
Abundancia de raíces tróficas	Colonización >10%	Contaminantes < 50%					
Conteo raíces tróficas				Comentario			
Cuadro	T. mel.	No Mic.	Contamin.				
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
Sumas:	T =	N =	C =				
PT = T/N+C =							
PC = C/T =							



# Apéndice 3.

## Hoja de datos de lote

Evaluación de plantas de <i>Quercus ilex</i> inoculadas con <i>Tuber melanosporum</i>												
Lote:		Vivero:		Fecha:								
Planta	Calidad planta	1 <sup>a</sup> 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))
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

	Intervalos de confianza	
	lim. infer.	lim. sup.
PT		
PC		
% Tuber		
% Contam.		

## Apéndice 4. Hoja de datos de segunda evaluación

Evaluación de plantas de <i>Quercus ilex</i> inoculadas con <i>Tuber melanosporum</i> : Segunda evaluación										
Lote:			Vivero:			Fecha:				
Planta	Calidad planta	1* Observ.	Lim. inf. IC	Lim. sup. IC		Planta	Calidad planta	1* Observ.	Lim. inf. IC	Lim. sup. IC
1						46				
2						47				
3						48				
4						49				
5						50				
6						51				
7						52				
8						53				
9						54				
10						55				
11						56				
12						57				
13						58				
14						59				
15						60				
16						61				
17						62				
18						63				
19						64				
20						65				
21						66				
22						67				
23						68				
24						69				
25						70				
26						71				
27						72				
28						73				
29						74				
30						75				
31						76				
32						77				
33						78				
34						79				
35						80				
36						81				
37						82				
38						83				
39						84				
40						85				
41						86				
42						87				
43						88				
44						89				
45						90				

## Apéndice 5. Cuadrícula

B	A	C	A	C	A	D	D	A	D	C	A	C	A	A	C
D	D	A	C	B	A	A	D	A	A	B	B	B	B	C	C
D	C	A	B	B	B	A	A	D	C	C	C	C	A	D	A
A	C	A	B	D	D	C	D	B	A	A	D	C	C	D	B
C	D	D	A	C	B	B	C	C	B	D	A	A	C	B	A
B	C	C	C	A	C	B	A	D	D	B	D	D	D	B	B
A	D	A	D	B	B	D	C	A	A	C	A	A	D	B	B
B	C	A	B	B	B	A	A	D	A	A	D	A	D	A	D
B	A	B	A	B	C	B	C	A	A	C	C	D	D	B	D
B	D	D	B	C	D	D	D	D	B	A	D	B	C	A	D
C	D	A	D	D	B	A	C	A	D	B	C	B	C	D	D
C	C	C	A	B	A	C	C	A	B	A	D	D	D	A	C
C	D	D	A	C	A	A	D	C	B	D	B	C	B	A	A
C	A	C	C	A	C	D	A	B	A	D	A	B	C	C	C
D	D	C	D	A	A	A	C	C	C	A	D	B	B	B	D
A	B	C	B	D	D	A	A	C	D	C	B	A	D	A	C
B	D	A	D	C	C	C	D	A	C	A	B	B	A	C	A
D	C	A	D	A	C	D	A	A	A	A	C	D	D	A	A
D	C	A	D	D	B	A	C	B	A	A	D	B	C	B	C
B	A	B	C	A	D	A	B	C	B	C	A	D	B	A	C
D	B	C	D	B	B	B	C	B	C	C	C	B	D	C	D

## Apéndice 6.

### Análisis de costes

#### Estimación de costes de control de una planta de *Quercus ilex* micorrizada con *Tuber melanosporum*

Costes de analista	
Tiempo por planta	min.
* Lavado de la planta	4
* Evaluación de calidad de planta	1
* Primera observación	5
* 2 preparaciones aplastadas	6
* Rellenar la hoja de datos	1
* Preparar raíces en la cuadrícula	3
* Contar 250 ápices	20
* Calcular proporciones	2
** Calcular intervalos de confianza	1
** Preparar informe	1
** Mantenimiento laboratorio	2
* Tiempo muerto laboratorio (10%)	5
Viajes (3)	6
<b>Total (min)</b>	<b>57</b>
<b>Total (Pts) (1)</b>	<b>2.320</b>

Costes de equipamiento (2)				
Equipo	Coste (x1000 Pts)	Plazo amort. (años)	Coste/ año (x1000 Pts)	Coste/ planta (Pts)
Ordenador	250	4	63	72
Programas	70	4	18	20
Microscopio Estereoscópico	1.776	10	178	206
Microscopio óptico	1.532	10	153	177
Sistema fotográfico	1.350	5	270	313
<b>Total (Pts)</b>				<b>788</b>

<b>Material fungible</b>	<b>30</b>
<b>Viajes (2)(3)</b>	<b>176</b>

Coste total por planta		
Analista	2.320	63%
Equipamiento	788	21%
Material fungible	30	1%
Viajes	176	5%
Costes indirectos (10%)	368	10%
<b>Total (Pts)</b>	<b>3.682</b>	<b>100%</b>

\* tiempo basado en una planta

\*\* tiempo basado en un lote de 12 plantas

(1) Basado en 2,459 pts/h

(2) Basado en 8 plantas/día, y 120 días/ año (Enero-Marzo y Septiembre-Noviembre)

(3) 12 viajes al año de 300 Km y 1 día de duración (24 pts/Km, 5500 pts/día)