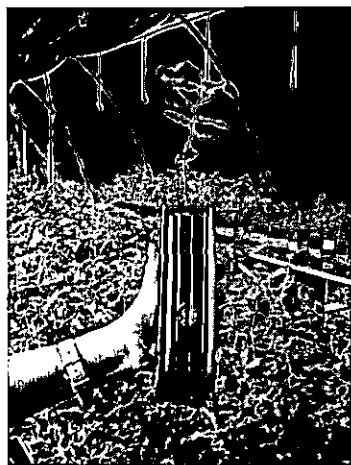


## INORME ANALISIS DE MICORRIZACIÓN

### METODOLOGÍA

Se realizó el análisis de micorrización de la planta inoculada con *Tuber melanosporum*, para las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur* y *Nothofagus obliqua*, después de 6 meses de incubación en invernadero.

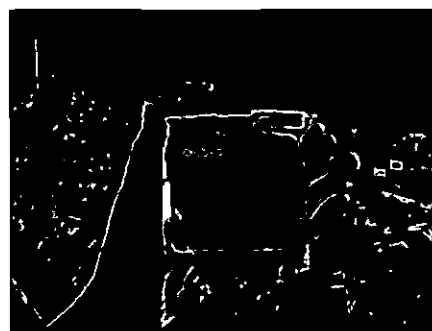
Se tomó una muestra de 16 plantas por especie, seleccionadas en forma aleatoria. Posteriormente se realizó un muestreo en volumen de los cepellones, de la siguiente forma: Del cepellón de cada planta, cultivada en contenedor, se extrajo con un sacabocados una muestra cilíndrica de 1,27 cm de diámetro en la zona media del contenedor y una longitud equivalente a la anchura del contenedor a esa altura, esto supone un volumen muestreado del orden de 7 cc., equivalente, aproximadamente, a un 2% del volumen del contenedor. La muestra cilíndrica se extrajo en sentido horizontal. Para ello se saca la planta del envase y se coloca en otro en el que se ha realizado ya una perforación a media altura, y se introduce el sacabocados imprimiendo una rotación constante para procurar el corte de las raíces y evitar su rotura (**fotografías 1, 2 y 3**). Las muestras extraídas en la zona media del contenedor se consideran suficientes, ya que en ensayos previos realizados por Reyna, 1999, no se obtuvieron diferencias significativas entre el estrato medio y el superior, ni entre el medio y el inferior.



Fotografía 1.



Fotografía 2.

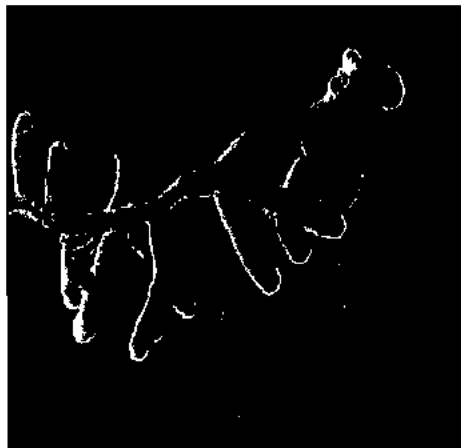


Fotografía 3.

Ya extraídas las muestras se procesaron en laboratorio para su análisis. Este proceso consiste en eliminar las partículas de sustrato adheridas a las raicillas. Se realizan varias decantaciones sucesivas incorporando agua destilada más un surfactante (Tween 80). Con ello se logra la eliminación de arcillas, limos y parte de la materia orgánica. La manipulación se hace con el máximo cuidado para evitar la pérdida de ápices radiculares.

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

Cuando se presentan dudas sobre el reconocimiento de alguna micorriza se comprueba al microscopio las características anatómicas de la especie (**Fotografías 4 y 5**), comprobándose que se trata de micorrizas de *T. melanosporum*. La información obtenida en análisis microscópicos es contrastada con trabajos publicados en bibliografía especializada (Zambonelli, et al 1993; Rausher, Agerer, y Chevalier, 1995; Etayo y de Miguel, 1998; Reyna, 1999).



Fotografía 4. Aspecto general de micorrizas de *T. melanosporum* en *Quercus robur* (40x).



Fotografía 5. Detalle de manto y espinulas de una micorriza de *T. Melanosporum* (400X)

Para cuantificar los niveles de micorrización, se contabilizó el número de micorrizas de *T. melanosporum*, ápices no micorrizados y contaminaciones con otras micorrizas. Todas las referencias se calculan en volumen, la alternativa de referirlo a peso de la muestra da mayores diferencias debido a las diferencias de humedad, espacios o falta de uniformidad del sustrato.

## RESULTADOS

La tabla 1. muestra los criterios de calidad aplicados para el análisis de micorrización:

| Tabla 1. Grados de calidad de planta micorrizada con <i>Tuber melanosporum</i> |                             |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Metodología CEAM (Reyna, 1999)                                                 |                             |
| n° de micorrizas por planta (TM/Planta)                                        | Calidad de la micorrización |
| 1-100                                                                          | Insuficiente                |
| 101 -250                                                                       | Escasa                      |
| 251-500                                                                        | Aceptable                   |
| 501- 1500                                                                      | Buena                       |
| 1500-3000                                                                      | Muy buena                   |
| > 3000                                                                         | Excelente                   |

| Tabla 2<br>Calidad de los lotes analizados de acuerdo con los criterios propuestos |                                         |                       |                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ESPECIE                                                                            | Promedio N° micorrizas de TM por planta | Calidad micorrización | Observaciones                                                                                |
| <i>Quercus ilex</i>                                                                | 2.338                                   | Muy buena             |                                                                                              |
| <i>Quercus robur</i>                                                               | 2.957                                   | Muy buena             | Se presentaron algunas contaminaciones con la especie <i>Inocybe</i> sp. (No significativas) |
| <i>Nothofagus obliqua</i>                                                          | 2.672                                   | Muy buena             |                                                                                              |
| Valores medios                                                                     | 2.656                                   | Muy buena             |                                                                                              |



Fotografía 3. Aglomeración de micorrizas de *T. melanosporum* y *Nothofagus obliqua* (Magnificación 40X)



Fotografía 4. Manto en puzzle de ectomicorrizas de *T. melanosporum* y *Quercus ilex* (Magnificación 400x)

## BIBLIOGRAFÍA

- ETATO, M.L. Y DE MIGUEL, A.M., 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Oloriz (Navarra). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 11: 55-114.
- RAUSCHER, T., AGERER, R., y CHEVALIER, G., 1995. Ektomycorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. Nova Hedwigia 61: 281-322.
- REYNA, S.; 1999. Aproximación a una selvicultura trufera . Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- ZAMBONELLI A, SALOMONI S, PISI A.; 1993 Caraterizzazione anatomo-morfologica delle micorrice di *Tuber* ssp. su *Quercus pubescens* Willd. mic. Ital.1993, 3 , 73-90.



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

ANEXO 1.2.

**PERSPECTIVAS PARA EL CULTIVO DE TRUFA NEGRA**  
**(*Tuber melanosporum* Vitt.) EN CHILE**

**Universidad Católica del Maule**  
**Departamento de Ciencias Forestales**  
**Proyecto C01-1-A-085**

**Talca, Chile**  
**Marzo 2003**



## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los hongos comestibles, las trufas se encuentran dentro de los más apetecidos alrededor del mundo. En particular, la trufa negra del Perigord (*Tuber melanosporum* Vitt.) es calificada junto al azafrán, caviar y foie gras como uno de los productos más valorados dentro de la gastronomía internacional.

Las trufas son los cuerpos reproductivos de varias especies de hongos ascomicetos y cumplen la función de producción y dispersión de esporas sexuales. A diferencia de las setas o callampas comunes (*Suillus* sp., *Boletus* sp., *Lactarius* sp.), que dependen del viento para dispersar sus esporas, las trufas crecen bajo el suelo (hipógeas) y dependen fuertemente de animales que las consuman para así dispersar las esporas a través de sus fecas. Consecuentemente, estos hongos han desarrollado estructuras reproductivas que emiten fuertes aromas y de esta manera atraen a los animales que las detectan y consumen (Lefevre y Hall, 2001).

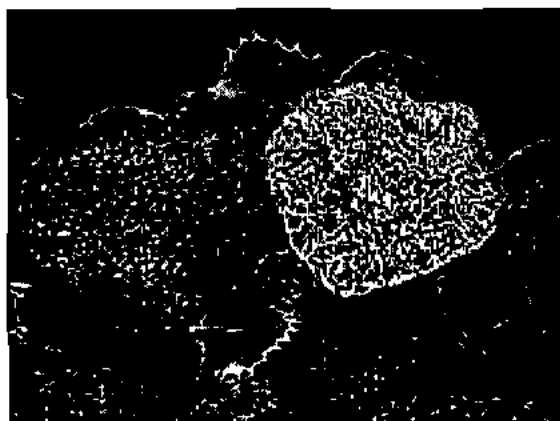


Fig. 1 *Tuber melanosporum*, Vitt.

El valor gastronómico de la trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) se debe a su fuerte y agradable aroma, siendo un complemento ideal para diversas preparaciones gastronómicas. Debido a su alto precio, es consumida en pequeñas cantidades como un condimento o saborizante. Algunas preparaciones que son complementadas con trufa son por ejemplo huevos, quesos, pastas, aceites, paté de foie gras, carnes y algunos mariscos. Generalmente se evitan los alimentos con sabores dominantes que pueden enmascarar el aroma de esta. El mayor valor gastronómico de la trufa es cuando se utiliza en fresco, ya que presenta todas sus cualidades características, al contrario al ser sometida a procesos de preservación, pierde su calidad y aroma. Sin embargo, gran parte de la producción anual es utilizada en conserva llegando a costar aún mayores precios. (Reyna, 2002; Hall et al., 2001).

Para localizar las trufas bajo el suelo, se requiere de animales que puedan detectar su aroma desde mayores distancias y a mayor profundidad que los humanos. En Francia, país con mayor cultura en torno a este producto, tradicionalmente se buscaba la trufa con la ayuda de cerdos, sin embargo en la actualidad se admite como forma de cosecha más adecuada, el uso de perros adiestrados para detectarlas. Los perros tienen la ventaja de no tener tendencia a consumirlas, a diferencia del cerdo, además el trabajo de este es más rápido. Otra forma muy particular que se ha utilizado para detectar las trufas bajo el suelo, es la aparición de una especie de mosca (*helomyza* sp.) que deposita sus huevos y cría sus larvas en las trufas maduras. También, algunos buscadores experimentados detectan el hongo observando la aparición de pequeñas grietas en la superficie del suelo, las cuales se producen por la fructificación del hongo a nivel más superficial. (Lefevre y Hall, 2001; Reyna, 2000; Saez y de Miguel, 1995).

Las producciones de trufa, en la actualidad, tienen en Europa, dos orígenes claramente diferenciados, Por una parte las que proceden de áreas productoras naturales y por otra las plantaciones truferas. Estas últimas vienen realizándose desde hace unos 25 años, con planta previamente infectada con el hongo en forma artificial (Reyna, 2000).

*Tuber melanosporum* es uno de los pocos hongos ectomicorrícicos que ha podido cultivarse a partir de huertos establecidos (truffieres). Los primeros resultados productivos se obtuvieron en la década del 70 después de 15 años de investigación por grupos en Francia e Italia. Posteriormente, las técnicas de cultivo han sido desarrolladas en España, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Australia, donde ya existen cultivos en producción, además se conocen trabajos en Israel, Sudáfrica y Argentina. (Reyna, 2000, 2002; Hall et al., 2001).

## 2. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *Tuber melanosporum* Vitt.

*Tuber melanosporum* forma una asociación simbiótica con algunas especies de árboles huésped. Esta asociación, llamada ectomicorriza, considera el envolvimiento de las raicillas del árbol por el hongo, formando una especie de manto que cubre estas raicillas. A partir del manto, nacen hifas que penetran en los espacios intercelulares de la raíz y a la vez, otras hifas emanan fuera del sistema radical, formando un micelio que cumple la función de exploración del suelo, aumentando por ende la superficie de absorción del sistema radical del árbol.

Este tipo de asociación es una relación benéfica mutua (simbiosis mutualista), ya que ocurren claros procesos de intercambio entre el hongo y su árbol huésped, donde el hongo recibe carbohidratos derivados de la fotosíntesis vegetal y a la vez el árbol mejora su nutrición mediante un aumento en la captación de minerales, principalmente fósforo, que es transferido desde el suelo a través del micelio del hongo. Cuando esta relación es perturbada por algún factor, la producción de trufas puede verse comprometida.

El establecimiento de la relación simbiótica entre *Tuber melanosporum* y su árbol huésped es la primera barrera que debe superarse antes de la implantación de una trufiera. Este punto resulta ser clave para el éxito en la producción de trufas, siendo de máxima importancia comprender la asociación entre el hongo y su árbol hospedero.

**Tabla 1.** Especies conocidas que forman asociaciones ectomicorrícicas con *Tuber melanosporum*:

| Nombre común                                                 | Nombre científico          |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------|
| roble pubescente*                                            | <i>Quercus pubescens</i>   |
| roble negro*                                                 | <i>Quercus petraea</i>     |
| encino o roble común*                                        | <i>Quercus robur</i>       |
| encina *                                                     | <i>Quercus ilex</i>        |
| coscoja                                                      | <i>Quercus coccifera</i>   |
| avellano europeo*                                            | <i>Corylus avellana</i>    |
| tilo                                                         | <i>Tilia sp</i>            |
| carpe blanco                                                 | <i>Carpinus sp</i>         |
| álamos                                                       | <i>Populus sp</i>          |
| castaño                                                      | <i>Castanea sp.</i>        |
| pinos                                                        | <i>Pinus spp</i>           |
| Jaras                                                        | <i>Cistus sp</i>           |
| cedros                                                       | <i>Cedrus spp</i>          |
| hayas                                                        | <i>Fagus spp</i>           |
| carpe *                                                      | <i>Ostrya carpinifolia</i> |
| saucos                                                       | <i>Salix sp</i>            |
| * Especies más adecuadas para producción comercial de trufas |                            |

Fuente: Hall, et al., 2001; Reyna, 1999, 2000.

Los diferentes requerimientos de desarrollo, de las especies arbóreas usadas en truficultura, proporcionan una oportunidad para seleccionar huéspedes adaptados a condiciones locales de crecimiento, manteniéndose dentro de los requerimientos específicos de *Tuber melanosporum*. En cuanto a este punto, cabe destacar que en Chile existen algunas especies ya adaptadas a nuestras condiciones ecológicas, como por ejemplo encinos (*Quercus robur*,

*Quercus ilex*) y avellano europeo (*Corylus avellana*), lo cual asegura la disponibilidad de material vegetal adecuado para el establecimiento de plantaciones.

En torno a los árboles truferos aparece un área concéntrica, desprovista de vegetación y que se denomina quemado (brûle), por el hecho de que prácticamente desaparecen todas las plantas no objetivo (malezas). El desarrollo del quemado y su avance en la periferia del árbol trufero, revela superficialmente la actividad subterránea del micelio de *Tuber melanosporum*. (Reyna, 2000).

La trufa (cuerpo fructífero) produce metabolitos primarios que provocan una acción selectiva en el medio, como consecuencia de los diferentes grados de resistencia que ofrecen los organismos afectados. Se cree que tiene un efecto antibiótico sobre las plantas no objetivo (malezas), debido a que emite una sustancia alelopática, la marasmina; se produce una disminución de la microflora y de la actividad bacteriana debido a procesos de amonificación, desnitrificación y descomposición de polisacáridos. Aunque en algunos casos actúa como antibiótico, también potencia una flora microbiana muy peculiar (Morcillo, 2000).

### **Características de suelo**

Las trufas, producidas en Europa, tanto en forma natural como cultivadas, se desarrollan sobre suelos calcáreos de 10-40 cm de profundidad del tipo rendzina, calcosoles y calcosoles. La principal característica de estos suelos es su alto pH (pH es una medida de la acidez - pH = 7 es neutro, pH < 7 es ácido y pH > 7 es alcalino), lo cual es causado por un alto contenido de carbonato de calcio (piedra caliza). Idealmente, el pH del suelo debe ser mayor que pH 7.5, con un óptimo de pH 7.9. (Hall et al., 2001; Hall y lefevre, 2001; Reyna, 2000; Saez y de Miguel, 1995). Sin embargo, de las ocho plantaciones que actualmente producen trufa, fuera de Europa (Nueva Zelanda, Tasmania y Estados Unidos), siete han sido establecidas sobre suelos ácidos que han sido enmendados con grandes cantidades de cal para ajustar su pH. (Hall, et al. 2001).

Además del pH, La textura del suelo y la materia orgánica son factores importantes a considerar. La mayoría de los suelos truferos en Europa, tienen niveles moderados de materia orgánica ( 3% a 8%), altos niveles de calcio y magnesio disponible para la planta, además presentan buen drenaje natural, con textura franca y estructura granular bien aireada. Además, es común en Europa, encontrar que los suelos donde se produce trufa, tanto natural como cultivada, presentan pedregosidad superficial.

Deben descartarse los suelos muy arcillosos por su compactación excesiva; muy limosos, limo-arcillosos o limo-arenosos, por su carácter muy desfavorable al apelmazamiento; y los suelos excesivamente arenosos, por su poca capacidad de retención de agua. La mejor estructura es la que asegura el máximo de aireación y, al mismo tiempo, la mayor facilidad para la penetración de las raíces del árbol y el micelio de la trufa. Estas características de suelo, resultan de un equilibrio en las proporciones de arena, limo y arcilla (Hall, et al 2001; Reyna, 2000 ).

**Tabla 2.** Características de suelo apto, según diversos autores

| PARÁMETRO                               | RANGO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7,5 - 8,5 (Palazón, et al., 2000)</li> <li>• 7,8 - 8,5 (Saez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 7,45 - 8,23 (Reyna, 1999)</li> <li>• &gt; 7,5 y óptimo de 7,9 y &lt; 8 (Hall et al., 2001)</li> <li>• En general el óptimo es 7,9</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Materia orgánica oxidable (%)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 - 10% (Palazón, et al., 2000)</li> <li>• 1,5 - 8 % (Saez y de Miguel, 1995)</li> <li>• mínimo 0,5 y max 17%, en Valencia media 3,2% (Reyna, 1999)</li> <li>• Cercano a 8%, según Hall et al., 2001</li> <li>• Óptimo estaría próximo a 3%</li> <li>• En Italia, las zonas trufas tienen un máximo entre 1,5 - 3% (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                       |
| Calcio intercambiable (% óxido cálcico) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt; 0,5 (Saez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 0,4 - 1,6 (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Caliza total (% CaCO <sub>3</sub> )     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mínimo de 10% (Saez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 0 - 83% (Reyna, 1999)</li> <li>• 1- 70 con media entre 20 - 56 y mínimo del 8 (Reyna, 1999).</li> <li>• En Italia media de 29,6% máximo de 83%</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Nitrógeno (Kjeldahl) (%)                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 - 0,3 (Bonet y Colinas, 1999)</li> <li>• 0,1 - 6 , con media 0,8 (Recopilación Reyna, 1999)</li> <li>• media de 0,26 en Valencia con max 0,57 (Reyna, 1999)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Fósforo (ppm)                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Fósforo asimilable (Olsen) (ppm)</u> 12 - 18 (Bonet y Colinas, 1999)</li> <li>• Varios autores indican entre 0 y 230 ppm, media 59,1 ppm (Reyna, 1999)</li> <li>• En Valencia, media de 29,5 ppm, min 6,66 y max 44,4 (Reyna, 2000)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Potasio (óxido potásico)                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 70 - 610 ppm (Recopilac. Reyna, 1999)</li> <li>• media 150,8 ppm, max 280, min 77 ppm (Reyna, 1999)</li> <li>• 100 - 300 ppm (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Magnesio intercambiable (%)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,01 - 0,03 % (Saez y de Miguel, 1995)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Textura                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Francos, no muy arcillosos ni excesivamente arenosos.</li> <li>• Arcillas: media de 29,1% fluctúa entre 4 - 68,5%</li> <li>• Limos: media de 37,5% fluctuando en 5 - 80%</li> <li>• Arenas: media de 38,2% fluctuando de 0,8 - 90% (Varios autores, según Reyna, 1999)</li> <li>• En Valencia: Franco arcillo-arenoso (arcillas 20 - 35%, arenas 50 - 80% y limos 0- 30%) (Reyna, 1999)</li> <li>• En Italia:<br/>Arenas: media 33,5% variando 0,8% - mas de 80%<br/>Limos: media 41,8% variando: 8 - 80%<br/>Arcillas: 24,8% variando 6 - 68,5%</li> </ul> |
| Estructura                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Granulosa o grumosa</li> <li>• Bloques subangulares, usualmente granular con aumento de las fracciones de arena o contenido de materia orgánica.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Ratio C/N                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6,7 a 20 (Recopilac. Reyna, 2000), Valencia media 7,92 + - 1,98 (Reyna, 1999).</li> <li>• 8 - 15 con óptimo 10-11 (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

## Clima y distribución geográfica

El clima general de las zonas truferas es predominantemente continental, presentando inviernos fríos y veranos calurosos. El régimen de precipitaciones de estas áreas de Europa, es el típico mediterráneo con sequía estival y máximo de precipitaciones en otoño (Hall, et al. 2001, Reyna, 2000).

Tabla 3. Resumen de principales parámetros climáticos de zonas truferas en Europa.

| PARAMETROS                                                     | Rango en Francia e Italia | Rango en España                  |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Precipitación anual (mm)                                       | 600 a 1500 mm             | 500 a 900 mm.                    |
| T° media anual                                                 |                           | 11 a 14 °C                       |
| T° diaria media verano<br>(enero, hemisferio sur)              | 17,5 ° a 22 °C            | 19 a 23 °C<br>(óptimo 20 a 22°C) |
| T° diaria media invierno<br>(Julio, hemisferio sur)            | 1 a 8°C                   | 1,6 a 8,2 °C<br>(óptimo > 2°C)   |
| Horas de sol anual                                             | 1900 a 2800               |                                  |
| Horas de sol en verano<br>(Octubre a marzo, hemisferio sur)    | 1200 a 1800               |                                  |
| Grados día acumulados<br>(septiembre a abril hemisferio sur) * | 900 a 1900                |                                  |
| FUENTE:                                                        | Hall, 2001                | Reyna, 2000                      |

\* T° diaria media sobre 10°C acumulada durante la estación de crecimiento

El rango de distribución natural de *Tuber melanosporum* en Europa, va desde los 40° a 47° de latitud norte, abarcando áreas del Noreste de España, Sur de Francia, Norte de Italia y pequeñas extensiones en Portugal, Suiza, Alemania, Hungría Bulgaria, Grecia y Ex – Yugoslavia. Se desarrolla en Europa en altitudes entre 100 y 1600 m., situándose las áreas de mayor altura en las regiones más meridionales. (Hall et al., 2001; Reyna, 2000).

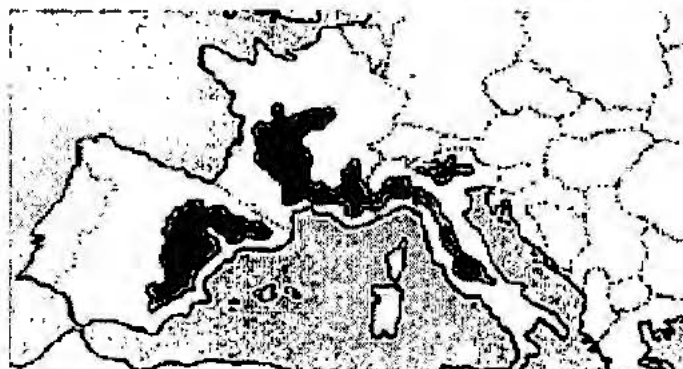


Fig. 2 Mapa de distribución de la trufa negra en Europa  
Fuente: Reyna, 2000.

En general en Europa, Las plantaciones artificiales con árboles inoculados con trufa se establecen cerca de las áreas que producen trufa silvestre, para así ajustarse al máximo a las condiciones ecológicas requeridas por el hongo y especies hospederas. Al contrario, en Nueva Zelanda se han establecido plantaciones, en áreas donde las condiciones de clima y suelo no son las ideales, pero que mediante técnicas agronómicas han podido manejarse para favorecer la producción de trufa (Hall et al., 2001).

A la luz de algunos resultados obtenidos en plantaciones artificiales de Europa y Nueva Zelanda, existe la posibilidad de que *Tuber melanosporum* pueda desarrollarse en áreas donde las condiciones ambientales no son las ideales, pero donde este no sea reemplazado por hongos mejor adaptados al medio. Sin embargo, mientras la trufa

no sea cosechada en forma regular fuera de las áreas de cultivo tradicional en Europa, debemos asumir que las condiciones que existen en ellas son las ideales.

## PRODUCCIÓN DE PLANTA MICORRIZADA CON TRUFA

El primer paso crítico para desarrollar el cultivo de trufas, es la implementación de un proceso efectivo de producción de plantas infectadas con el hongo en forma controlada. Este aspecto es de vital importancia ya que la entrada en producción de una plantación podría tardar entre 6 a 8 años. Por esta razón se debe asegurar la calidad en el proceso de micorrización en invernadero, donde pueden ocurrir contaminaciones con hongos sin interés comercial, que podrían afectar el resultado final.

La calidad de las plantas truferas depende sobre todo de la calidad de la micorrización, tanto de la pureza del inóculo, como de la proporción de raíces micorrizadas. La única forma de conseguir plantas de alta calidad es llevando un control riguroso del proceso productivo. En primer lugar hay que asegurar la calidad del inóculo, identificando cabalmente la especie y comprobar su madurez, evitando contaminaciones con hongos no deseados. Por otra parte al final del proceso de producción debe controlarse estrictamente los niveles de micorrización, basado en metodologías especializadas (Perrin, 1999).

La producción de planta micorrizada en Francia es llevada a cabo por 2 viveros especializados (Agri-Truffe y Viveros Robin), quienes son las partes contractuales de la tecnología de producción Licencia INRA. (Instituto Nacional de Investigación Agronómica). (Reyna, 2002; Hall et al., 2001). Estos procesos son llevados a cabo mediante sistemas controlados en invernadero.

En Italia existe una gran variabilidad en la calidad de las plantas truferas producidas por viveros, y aunque no existe un organismo oficial de certificación, últimamente una comisión de expertos ha puesto a punto un método de análisis que ha sido encargado por las regiones italianas. Se trata de un método de análisis con bases morfológicas, el cual establece los parámetros para el control de calidad. (Bencivenga, 1999).

Desafortunadamente, estas empresas no pueden garantizar absolutamente, que las plantas están libres de contaminaciones con otros hongos, tanto de micorrizas como patógenos, lo cual hace inviable su importación a nuestro país, debido al riesgo de introducción de plagas forestales u otros hongos competidores que pueden afectar la producción de trufa en plantaciones artificiales.

Estados Unidos y Australia han utilizado tecnología francesa para la producción y control de planta micorrizada, sin embargo en Nueva Zelanda se partió trabajando desde los principios básicos para desarrollar métodos de inoculación y control, lo cual ya ha tenido resultados productivos (Hall et al., 2001).

El primer paso crítico para establecer y desarrollar la truficultura en Chile, es el desarrollo de procesos adecuados para la producción de planta micorrizada con trufa, donde se debe realizar rigurosos controles, para así evitar contaminaciones y además proteger la integridad del rubro, ya que la adquisición de plantas con una calidad inadecuada podría ser antieconómico para los agricultores. Por esta razón, la Universidad Católica del Maule, en conjunto con la Fundación para la Innovación Agraria (Ministerio de Agricultura), se encuentra desarrollando un proyecto que sentará las bases técnicas para el establecimiento y producción de trufa negra en Chile.

Para esto, en una primera etapa, se han implementado tecnologías de producción de planta micorrizada, mediante condiciones controladas en invernadero para las especies avellano europeo (*Corylus avellana*) y encinos (*Quercus spp.*) inoculados con la trufa.



Fig. 3 Producción de planta micorizada en Chile.

## ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES

### Selección del terreno

A diferencia de Europa, donde los suelos comúnmente tienen alto pH (7.5 a 8.5), los suelos en Chile tienden a tener un pH relativamente bajo (rangos entre 5.5 a 7.0). Existen algunas zonas que presentan suelos de origen calcáreo (pH alto), sin embargo, su ubicación está fuera de las áreas climáticamente más adecuadas. Los principales depósitos calcáreos en Chile se encuentran entre la I y IV Región, donde los regímenes térmicos y pluviometría no son adecuados para el establecimiento de plantaciones.

De acuerdo a información preliminar, zonas con potencial para establecer plantaciones en Chile pueden encontrarse en la zona centro-sur, principalmente entre la VI y X Región, Aunque también puede extenderse a algunas áreas más al sur (XI Región) y hacia el norte (Región Metropolitana). En cuanto a los requerimientos de suelo para la trufa, los cuales deben tener un alto pH, existen áreas posibles de implantar en la región Metropolitana (Valle del Maipo) y VI Región, donde algunos suelos derivan de depósitos aluviales (mollisoles) con alto contenido de material calcáreo en el perfil. Sin embargo las de riego en estas zonas son mayores. Más al sur VII y X región se encuentran zonas con una climatología más adecuada, pero difícilmente encontraremos suelos calcáreos, por esta razón se deben realizar fuertes enmiendas con cal (carbonato de calcio) para corregir este déficit. Cabe destacar que la truficultura es muy poco exigente en cuanto a fertilidad de suelos, además dentro de la especificidad del hongo existe un rango relativamente amplio de temperaturas y pluviometría. Esto resulta interesante ya que se pueden establecer plantaciones en zonas precordilleranas y en suelos marginales para la agricultura tradicional, no compitiendo por suelos con cultivos intensivos.

Para seleccionar un sitio a plantar, se debe tener especial cuidado con la presencia de hongos de ectomicoriza adaptados al medio. El sitio a ser seleccionado para el establecimiento de una trufiera idealmente no debería situarse muy cerca de cualquiera de los árboles listados en la tabla 4, para evitar la contaminación con hongos naturalizados, que pueden competir con la trufa y desplazarla del medio.

Tabla 4. Especies presentes en la zona centro sur de Chile, conocidas a formar asociaciones ectomicorrícicas y que pueden albergar potenciales hongos competidores.

| Nombre común      | Nombre científico       |
|-------------------|-------------------------|
| encinos           | <i>Quercus sp.</i>      |
| avellano europeo  | <i>Corylus avellana</i> |
| Tilos             | <i>Tilia sp</i>         |
| álamos            | <i>Populus sp</i>       |
| Castaños          | <i>Castanea sp.</i>     |
| eucaliptos        | <i>Eucaliptus sp.</i>   |
| pinos             | <i>Pinus spp</i>        |
| Sauces            | <i>Salix sp.</i>        |
| Robles*           | <i>Nothofagus sp.</i>   |
| *Especies nativas |                         |

Dentro de la flora nativa, Chile presenta pocas especies de árboles nativos que forman ectomicorrizas, principalmente del género *Nothofagus*. La expansión de plantaciones industriales como el pino radiata y eucaliptus, podría aumentar la incidencia de hongos que pueden competir con nuevas especies introducidas, pero aún hay muchas áreas donde la flora fúngica es escasa, principalmente en los suelos utilizados por la agricultura tradicional.

Se recomienda siempre la plantación de especies micorrizadas en aquellos terrenos cuyos cultivos anteriores hayan sido cereales o leguminosas. Se admite también como buenos precedentes las viñas y algunos frutales. La plantación en terrenos deforestados suele plantear problemas, ya que la vegetación arbustiva y forestal deja el suelo colonizado por numerosos hongos, competidores potenciales de la trufa, pudiendo desplazarla del medio.

La elección exacta de los sitios para establecer plantaciones, requiere rigurosos análisis de las características químicas y físicas del suelo, pendiente, exposición, pluviometría, vegetación circundante e historial de cultivos. La selección del sitio debe ajustarse al máximo a las condiciones ecológicas exigidas por la trufa, lo cual asegurará en gran medida el éxito de la futura producción.

## Preparación del terreno

El objetivo de la preparación del suelo es producir un suelo bien aireado con características físicas y químicas similares, a aquellas donde las trufas crecen naturalmente en Europa. Desafortunadamente no se pueden dar recomendaciones generales sobre la preparación del suelo, ya que dependerá de los resultados de análisis de suelo específicos.

La preparación del suelo para la plantación depende, en parte, de cual era el uso anterior del terreno. Si el uso anterior era forestal, (poco recomendable) a parte de las labores propias de la transformación, es muy conveniente cultivar al menos durante dos años algún tipo cereal o forrajera. Es favorable la quema de los restos *in situ* en vez de eliminarlos o incorporarlos. La ceniza sube el pH del suelo y el calor lo esteriliza superficialmente (Reyna, 2000).

Si partimos de un cultivo de cereal o leguminosa (lo más recomendable), se debe comenzar con la rotura del suelo, tratando de no modificar los horizontes. Según Palazón, 1999 se puede hacer una labor poco profunda de hasta 20 cm. para romper el suelo (Disco, vertedera, etc.). Reyna, 2000 recomienda una labor con arado de vertedera de hasta 40- 50 cm. de profundidad y dejar reposar el terreno hasta la plantación. Las herramientas y aperos a utilizar en las labores de preparación deben ser rigurosamente desinfectadas para evitar la introducción de hongos competidores en el sitio. Después del arado es conveniente realizar una labor con discos para igualar el terreno y deshacer terrones, este trabajo es preferible hacerlo al final del invierno principios de primavera.



Puede resultar interesante realizar un subsolado a 60-80 cm de profundidad para romper la "suela de labor" que se forma con cierta frecuencia en los cultivos como consecuencia de las labores continuadas año tras año a la misma profundidad. Si el suelo es poco profundo o pedregoso puede acondicionarse con un subsolado lineal que rompa los estratos más profundos facilitando la infiltración del agua en los horizontes inferiores donde como consecuencia del mullido del suelo podrá ser retenida en mayor proporción.

El rango de pH ideal de un suelo para la plantación debería estar entre 7.5 a 8.3 con un óptimo de 7.9. Si el pH natural del suelo es menor, se debe corregir mediante la aplicación de carbonato de calcio (cal agrícola). Corregir el pH del suelo puede tomar varios años con aplicaciones de cal anual, pero los árboles pueden plantarse antes de que el pH se encuentre en su nivel ideal. Sin embargo, si el pH del suelo es bajo puede suceder que hongos mejor adaptados al medio colonicen las raíces de los árboles y compitan con la trufa, pudiendo desplazarla. Por tal razón, lo recomendable sería elevar el pH del suelo al nivel deseado antes de establecer la plantación, para así dejar en desventaja a los potenciales hongos competidores que pueden invadir las raíces.

La cantidad de cal a aplicar para elevar el pH, dependerá fundamentalmente del pH inicial, textura del suelo, su capacidad Buffer (medida de la resistencia del suelo al cambio de pH) y el tipo de cal a utilizar. En base a estos parámetros, se calcula la recomendación de encalado, lo cual debe ser realizado por un laboratorio especializado. Sin embargo, los especialistas de suelos en Chile, tendrán dificultad en predecir la cantidad de cal requerida para elevar el pH, ya que normalmente no existen experiencias en aplicaciones de cal a estos niveles. Por lo tanto, la tarea para el cultivador de trufas en Chile será aplicar la cal incrementalmente, realizando controles periódicos del pH del suelo, hasta lograr el pH ideal.

Normalmente, los diferentes tipos de cal comercial existentes en Chile, tardan en reaccionar como máximo en un año para elevar el pH, pero normalmente el efecto se produce dentro de un período de seis meses después de la aplicación. Sin embargo, es difícil encalar a estos niveles mediante una única aplicación, por lo tanto el encalado necesariamente debería ser gradual.

En cuanto a la duración del efecto de la cal en el tiempo, no se conoce cuánta cal adicional tendrá que ser aplicada para mantener un alto pH en suelos naturalmente ácidos. Sin embargo, podemos decir que si después de aplicar la cal, el pH es estable por dos años, no será necesario encalar anualmente, sino mas bien un par de veces cada 8-10 años como encalado de mantención.

Cuando el terreno presenta un suelo ácido, sobre un subsuelo rico en material calcáreo, solamente puede ser necesario labores de arado para voltear las capas más profundas y así elevar el pH. Al contrario si el suelo y subsuelo presentan pH ácido, se necesita aplicar grandes cantidades de cal hidratada o cal agrícola para elevar el pH en las capas superficiales del suelo (20 a 30 cm.).

## **Establecimiento de la plantación**

Los marcos de plantación, preferiblemente deben ser amplios, dependiendo de la especie simbiote, condiciones de suelo y clima y de las técnicas de cultivo a utilizar. Pueden oscilar desde 5x4 m. hasta 7x7 m.

### Depende fundamentalmente de varias cuestiones:

El desarrollo que previsiblemente tendrán los árboles, si se trata de avellanos que rara vez pasan de 3 o 4 m de altura el marco puede ser menor que si se trata de encinos que fácilmente sobrepasan los 10 m.

Plantaciones densas suponen una costosa inversión a veces muy poco recompensada. Cuando se realizan plantaciones muy densas, además de aumentar el costo, se planteará en el futuro la necesidad de eliminar árboles con objeto de permitir la insolación del suelo, encontrándonos con el grave problema de tener que decidir cuales son los árboles a cortar de modo que no eliminemos ninguno de los que esté en producción.

En principio son más recomendables los marcos reales (aquellos que sus 2 dimensiones son idénticas) que los desiguales, pero si se opta por estos últimos la orientación de los pasillos deberá ser Sur-Norte para que reciban el máximo de insolación en el suelo. Una solución intermedia, pero también cara, es la plantación a marco desigual para trasplantar a los 3 - 4 años las plantas intermedias a otra zona donde se podrán utilizar como planta definitiva.

#### Colocación de las plantas:

Se debe marcar con cañas o listones de madera para señalar los puntos de plantación. La planta debe llevarse al terreno bien humedecida donde se irá distribuyendo por todo el sitio para facilitar el trabajo de plantación. El suelo, debe estar bien mullido, y suelen ser suficientes 3 o 4 golpes con azada para abrir un hoyo suficiente para la colocación de la planta.

Puede ser muy útil usar tubos protectores (shelters), los cuales fomentan el crecimiento en altura, evitan la pérdida de agua por transpiración y protegen la planta de los posibles daños del ganado o la fauna silvestre.

### **CULTIVO Y MANEJO DE PLANTACIONES**

Durante los 3 primeros años deben hacerse desmalezados, poco profundos, a mano con azada alrededor de las plantas esto evita la competencia de malezas y contribuye a retener la humedad. Deben darse las labores necesarias (normalmente 1 o 2 al año en primavera) para airear el terreno y controlar malezas. Estas labores nunca deben superar los 15 - 20 cm de profundidad, para ello son adecuados los arados de cincel o disco.

La labor no debe aproximarse mucho a las plantas para no deshacer la zona de los quemados ni afectar la expansión incipiente de los sistemas radicales.

Si se instalan tubos protectores a las plantas conviene quitarlos en cuanto la planta comience a asomar por encima teniendo, la precaución de tutorarla para que no caiga por la altura excesiva en relación al escaso grosor del tallo.

En los primeros años no es aconsejable la instalación de riego por aspersión o microaspersión, dado que el control de malezas será mas intensivo (aunque en esta fase, por el contrario, el riego por goteo puede ser muy útil).

Se debe mencionar que un exceso de agua puede fomentar la aparición de otras micorrizas de tipo más higrófilo lo que irá en detrimento de las producciones futuras. Insistimos que con los riegos excesivos se corre el riesgo de modificar la ecología hasta un extremo en que la trufa deje de ser competitiva. Si las raíces crecen más deprisa que el hongo, la micorrización no se propaga y existen muchas posibilidades de que se formen micorrizas de otras especies.

A partir del 4º año de plantación pueden empezar a aparecer los primeros síntomas de la producción trufera con quemados alrededor de alguna de las plantas; en este caso debe interrumpirse el laboreo en los quemados o hacerlo muy superficialmente con una simple rotura de la primera capa del suelo que no profundice mas allá de los 10 cm.

Puede en estos primeros años dar podas muy ligeras de formación a fin de ir conduciendo las plantas hacia portes arbóreos que permitan la insolación y aireación del suelo así como eliminar los rebrotes basales.

Poco a poco los quemados irán desarrollándose y a partir de los 6-8 años es posible que comience la producción de trufa. Sin embargo en condiciones óptimas de cultivo las producciones pueden comenzar antes (4-6 años).

## Laboreo del suelo

Los objetivos del laboreo de las truferas en producción son:

- Eliminar la vegetación adventicia que compite con el micelio de la trufa y con la encina, por el agua y los nutrientes del suelo.
- Mantener la esponjosidad del suelo para facilitar su aireación y con ella la oxigenación y permeabilidad del agua de lluvia.
- Mejorar la capacidad del suelo para retener agua y la condensación de humedad
- Evitar la pérdida de agua por evaporación al romper los capilares superficiales que se forman entre las partículas del suelo.
- Mejorar la infiltración del agua de lluvia en el suelo evitando la escorrentía superficial.

El laboreo en las truferas, realizado inadecuadamente (demasiado profundo), tiene el grave riesgo de destrucción del micelio extendido por el suelo y de las micorrizas más superficiales. En consecuencia es necesario tener en cuenta esta limitación a la hora de decidirse a dar una labor a truferas en producción cuando se labra por primera vez. La profundidad de la labor no debe superar nunca los 10-15 cm en las zonas del quemado próximas a las plantas, donde aun crece algo de vegetación adventicia y son abundantes los rebrotes. En las zonas más activas del quemado la profundidad se limitará más, reduciéndose a 10 cm. Los primeros años en los que se trabaja la tierra, las profundidades anteriormente indicadas deben reducirse a la mitad a fin de lograr una adaptación progresiva al laboreo. Si el suelo es muy pedregoso o muy escaso es preferible no dar ningún tipo de labor.

La experiencia de los truficultores, especialmente franceses donde el laboreo es bastante corriente, aconseja dar una sola labor al año al finalizar la campaña de recolección. De esta forma se retiene el tempero de la tierra logrado con las lluvias de la primavera, en un momento en el que la actividad vegetativa apenas se ha iniciado. Se debe evitar las compactaciones producidas por tractor, por lo cual no debe utilizarse si el suelo tiene excesiva humedad.

En Italia se utilizan cultivadores con aperos a los que se acopla un limitador de profundidad consistente en un rodillo intercalado que impide que el apero profundice más de 10 o 15 cm. También se ensayan motoazadas modificadas que no producen ni arrastre del suelo ni volteo de horizontes.

No son recomendables las fresadoras tipo "rotovalor" ya que además de voltear el suelo pueden producir una compactación en profundidad (suela de labor). Tampoco se deben utilizar aperos que puedan producir arrastres de tierra.

## Podas

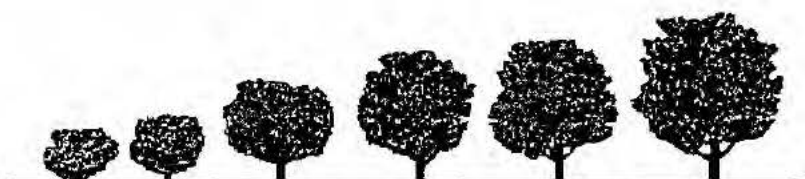
Objetivos:

- Permitir la aireación y la insolación del quemado.
- Lograr un crecimiento equilibrado del árbol.
- Evitar rebrotes de cepa y de raíz.
- Controlar la espesura de la plantación.
- Evitar el excesivo desarrollo en altura de algunas especies

La intensidad de la poda debe ser muy baja a fin de evitar desequilibrios nutricionales y fisiológicos que pudieran afectar a las micorrizas evitando cortar ramas muy gruesas y por supuesto los desmoches. En plantaciones truferas pueden comenzar a formarse los árboles a partir del 4º año.

Nunca se debe eliminar más de un 15 al 20% de la masa foliar. Las podas son mejores cuanto más frecuentes y menos intensas. Pueden recomendarse las siguientes cifras orientativas:

| <u>Edad de la planta</u> | <u>Frecuencia de la poda</u>      |
|--------------------------|-----------------------------------|
| 3 a 10 años              | Anual                             |
| 10-20 años               | Cada 2 años                       |
| > 20 años                | Cada 3 a 5 años (según necesidad) |



Formación del árbol trufero en plantaciones

### El riego en truficultura

El riego es uno de los sistemas más eficaces para mejorar la producción de las truferas, ya que con él se evitan las sequías prolongadas. De acuerdo a la situación europea, existe una correlación clara entre las precipitaciones estivales y los buenos años de producción. (Reyna, 2000). Puede darse como norma que en los meses de verano (enero-febrero) se incorporan al suelo entre riegos y lluvia del orden de 150 l/ m<sup>2</sup>. Deben permitirse periodos de sequía de 15 a 20 días y no superiores a los 25 días. Esto lógicamente variará con el tipo de suelo.

En Europa en general los años de buena cosecha con producciones superiores a la media, se producen cuando las lluvias de agosto (verano europeo) superan los 40-50 mm y que el óptimo tiende a situarse cuando las lluvias de agosto alcanzan los 80 mm (Reyna, 2000). Ante la imposibilidad de prever la lluvia anticipadamente con una seguridad suficiente es preferible disminuir la frecuencia entre riegos y hacerlos algo más abundantes en agua. Esta forma de regar es más parecida al régimen tormentoso estival de las mejores zonas truferas en Europa. Los riegos durante los 6 a 10 primeros años tan sólo deberían ser de estricto apoyo a las plantas, a partir de ese periodo, cuando ya haya comenzado la producción, pueden darse riegos como los indicados anteriormente.

El control del agua incorporada es fundamental en truficultura, lo cual se puede llevar a cabo mediante el uso de instrumentos de medición como por ejemplo tensiómetros.

### Sistemas de riego:

#### Riego por goteo

- En el riego por goteo se obtiene el máximo de ahorro en agua, la presión de trabajo es mínima, normalmente son suficientes 0.5 a 1 Kg/cm<sup>2</sup>.
- El caudal instantáneo puede ser muy bajo si se sectoriza el riego, así con 10 sectores, uno por ha de superficie, se precisarían del orden de 30 a 60 l/minuto.
- Las instalaciones de goteo son convertibles a microaspersión.
- Como inconveniente del goteo hay que citar la gran localización del agua que generalmente no suele mojar más de un 25 % del suelo.
- Hace dificultosas las labores de arado y eliminación de restos de poda, siendo necesario a veces retirar las mangueras y luego volverlas a extender.

### Riego por microaspersión

- En la microaspersión se requiere algo más de presión que en el goteo, de 1 a 1,5 Kg/cm<sup>2</sup> con caudal instantáneo máximo, también contando con 10 sectores, del orden de 100 a 150 l/minuto.
- Como inconvenientes hay que indicar la dificultad en las labores de arado y poda en mayor proporción que el goteo.
- Obligatoriedad de regar sin viento dada la deriva de las gotas que son de pequeño tamaño.

### Riego por cañón enrollable

- En el caso del cañón se necesita una presión de trabajo de 5 Kg/cm<sup>2</sup> y un caudal instantáneo del orden de los 500 a 600 l/minuto, lo que nos permitiría regar entre 30 y 50 ha.
- La instalación de riego no dificulta los trabajos de laboreo como sucede en las otras dos alternativas.
- Inconveniente de este sistema es que las superficies deben ser grandes y que si no están bien ajustados la distribución de agua puede ser bastante irregular.

### Riego por aspersión

El riego por aspersión con aspersores de caudal medio es otra alternativa de mayor costo que el cañón. En general no está muy extendido su uso en las plantaciones truferas.

Recomendaciones:

- Como orientación general se puede recomendar para explotaciones de menos de 10 hectáreas, comenzar con riego por goteo y pasar a microaspersión a los 4 a 6 años.
- Si la superficie es superior a 30 ha claramente interesa el cañón de aspersión.

## **Acolchado o Mulching**

Con este nombre se conoce técnicamente la práctica de recubrir un suelo con restos vegetales u otro material inerte (Plásticos, geotextiles, etc.) a fin de conservar la humedad el máximo tiempo posible, sin que exista prácticamente aporte de nutrientes al suelo.

En las truferas naturales en Europa, esta función la realiza la pedregosidad superficial que recubre el quemado y que según la mayor parte de los truferos suele coincidir con los rodales de mejor producción. Muchos recolectores de trufa acostumbran a ir tapando las truferas con piedras relativamente gruesas a fin de lograr el mismo objetivo. Esta práctica está bastante extendida entre los truferos tanto españoles como del resto de Europa para lo cual prefieren utilizar piedras planas. Posiblemente sea el método más seguro, en el sentido de no tener efectos negativos, pero sólo es válido en el caso de truferas que no se cultiven. En la zona de Perigord y Provenza, en Francia, durante el verano se tapan muchas truferas con ramas de enebro retirándose al principio del otoño el grado de recubrimiento del quemado no suele sobrepasar el 50% de la superficie (Reyna, 2000).

## **Fertilizaciones**

La fertilización, en principio es desaconsejable sobre todo en las truferas en producción. La simbiosis es capaz de proporcionar al árbol una mayor proporción de fósforo, potasio y nitrógeno. Por ello un abonado podría hacer que el árbol prescindiera de su socio, la trufa, ante un suelo especialmente rico. Los resultados de experiencias de fertilizaciones que se conocen, son contradictorios y tan solo podría recomendarse en zonas especialmente pobres en fósforo un abonado con superfosfato de calcio a razón de 150 kgr/Ha (15gr/m<sup>2</sup>). Los abonos orgánicos, guano,

compost etc, son también desaconsejables ya que además de los elementos minerales que aportan incorporan una gran cantidad de microflora de efectos desconocidos en las truferas (Reyna, 2002).

La fertilización, únicamente puede plantearse como primordial para el establecimiento de la plantación. Tras los correspondientes análisis puede procederse a enmendar los suelos antes de dar comienzo a la plantación.

### **Plaguicidas y tratamientos fitosanitarios**

La utilización de herbicidas se realiza en Francia, con relativa normalidad, por los seguidores de modelos intensivos en truficultura. En Italia no se recomiendan con el fin de defender la trufa como un producto ecológico, plenamente compatible con el medio ambiente. En España se utilizan muy poco ya que la salida de malezas suele estar bastante limitada por las sequías. Entre los herbicidas más utilizados se encuentra el glifosato (Roundup®).

La presencia de hongos patógenos, como el oidio o blanquilla, las fumaginas, royas etc. no afecta prácticamente a la trufa y rara vez pone en peligro la vida del árbol. En general ataques intensos de estas enfermedades sólo se producirán en situaciones de desequilibrio grave como: sequías muy intensas, exceso de humedad, podas excesivas etc. La única recomendación en caso de considerar inevitable un tratamiento es no utilizar fungicidas sistémicos que circulan por la savia y podrían afectar las raíces y micorrizas.

### **Seguimiento de la plantación**

Al plantar árboles micorrizados por *Tuber melanosporum*, es de esperar que las micorrizas se desarrollen con éxito ante condiciones favorables y que ante la entrada de otras micorrizas como proceso natural inevitable, sea la trufa la que perdure. Frente a la entrada de micorrizas contaminantes, la intervención directa es prácticamente imposible, pero hay que conocerla y seguirla para no llevarse sorpresas a futuro.

El seguimiento de la micorrización supone los siguientes pasos:

- Recolección periódica de muestras de raíces
- Identificación de micorrizas (trufa y contaminantes)
- Conservación de muestras
- Posibles intervenciones

### **Toma de muestras**

La recolección de micorrizas debe realizarse sobre ejemplares elegidos al azar o bien por motivos concretos, como puede ser la aparición de "quemados" y el interés de conocer la especie que lo produce. Existen dos métodos sencillos, recogidos por trabajos generales de algunos autores: el método de los sectores y el método global. El método de sectores se aplica principalmente a árboles de cierta edad y con quemados muy aparentes. Por la laboriosidad de la recolección, solo es posible aplicarlo a un número reducido de árboles. Este método aporta con precisión el estado de la micorrización de ejemplares concretos y la distribución espacial de las especies de micorrizas presentes.

El método global, puede aplicarse a cualquier árbol, de cualquier edad, y que permite conocer la micorrización en un número mayor de ejemplares, lo que da una idea global del estado de micorrización en toda la plantación.

Para el muestreo se requieren algunas herramientas e insumos básicos como azadas, tijeras, bidón de agua, bolsa o frascos rotulables, etiquetas, etc.

Elegido el ejemplar a muestrear, se inicia la búsqueda de raíces superficiales cavando de a poco para no alterar considerablemente la tierra en torno al árbol. Luego se llevan las raíces al laboratorio para realizar el correspondiente análisis de micorrizas. El análisis de la micorrización consta de uno de tipo cualitativo donde se identifican las especies formadoras de ectomicorrizas y otro de tipo cuantitativo para evaluar los niveles de micorrización. Los instrumentos necesarios son principalmente equipos de microscopía y algunos reactivos básicos. Estos trabajos deben ser llevados a cabo por personal especializado.

### Cosecha de trufas

La recolección de trufas siempre ha sido problemática, debido a que el cuerpo fructífero de *Tuber melanosporum* se desarrolla bajo el suelo. Las trufas se reproducen por medio de esporas las cuáles para su dispersión necesitan de algún agente externo ya que crecen bajo tierra. Por esta razón su estrategia de dispersión se basa en la emisión de un fuerte olor el que atrae a animales principalmente mamíferos y algunos insectos. Estos se alimentan de los carpóforos y dispersan las esporas. *Tuber melanosporum* emite un fuerte olor característico y este puede ser delectado incluso por humanos, sin embargo para localizar la ubicación exacta de cuerpos frutales en una trufera es necesario la asistencia de cerdos o perros adiestrados para la recolección. Otro método sorprendente, es la búsqueda de trufas mediante la mosca *Helomyza tuberifera*, la cual pone sus huevos en trufas maduras. La presencia de estas moscas sobre el suelo evidencia la presencia de trufas. Este sistema tiene adeptos en Francia, más en aficionados que profesionales, ya que no es un sistema efectivo.

También hay que citar el uso de sensores electrónicos de aromas, se trata de aparatos aún en fase experimental basados en análisis de gases, la funcionalidad no está plenamente comprobada y su precio es muy alto. Por el momento este sistema no parece recomendable.

La búsqueda de trufas con perros es la práctica más conveniente, así como la más adecuada en todos los sentidos y la única legalmente permitida. El perro puede ser de cualquier raza. Al igual que en la caza auténtica, el perro debe ir retenido por las órdenes del amo, no debe alejarse excesivamente y debe repasar cada uno de los sectores de la trufera cuando se le indique. Cuando el perro encuentra una trufa se detiene, olfatea el suelo, lo rasca un poco con las patas delanteras y espera moviendo la cola, que se acerque el amo solicitando una recompensa (algo de comer). El trufero, con una especie de puñal especial, cuidadosamente desentierra la trufa, deja oler al perro y se le recompensa adecuadamente. Una vez extraída la trufa se vuelve a tapar el hoyo o pozo, siendo práctica normal enterrar hojas o poner una piedra encima, sin compactar excesivamente. Hay truferos que preparan su propio "compost" para incorporarlo en los hoyos de recolección (Hall et al., 2001; Reyna, 2000, 2002).



Fig. 4. Cosecha de trufas con ayuda de perro adiestrado, Castellón, España.

La forma de adiestrar al perro no tiene mucha complicación, es preferible entrenarlos desde jóvenes y especialmente para la búsqueda de trufas. En Europa se utilizan bastante perros pastores especialmente entrenados, aunque este puede ser de cualquier raza y tanto hembras como machos.

## PRODUCCIÓN Y MERCADO DE LA TRUFA

### Aspectos de producción

Las producciones de trufa, en la actualidad tienen en Europa dos orígenes bien diferenciados. Por una parte las que proceden de áreas productoras silvestres y por otra las plantaciones artificiales, las que vienen realizándose desde hace unos 25 años con planta micorrizada. Las cuales hoy en día están en plena producción.

En Europa es muy difícil evaluar la producción total, ya que existen pocos datos y registros fiables, además un cierto secretismo suele rodear al sector. Por ejemplo, estimaciones de la producción española dicen que estaría comprendida entre los 7.000 y 126.000 Kg anuales con una media de 40.240 Kg, donde casi el 90% de la producción se exporta a Francia (Reyna, 2000).

Las plantaciones europeas, en general no comienzan a producir antes de 8-10 años. Los datos referentes a producciones por hectárea son muy variables. Existen plantaciones con riego, con producciones regulares y constantes próximas a 100 kg/ha/año y por el contrario otras que apenas superan los 10 kg/ha. En plantaciones sin riego la variabilidad aún es mayor, donde en los mejores años pueden superarse los 120 kg/ha y los peores no llegan a 2kg/ha. En general los datos de producción media más utilizados se sitúan entre los 30 y 50 kg/ha/año.

En plantaciones con riego, desde el punto de vista financiero, el límite de la rentabilidad económica (para España) estaría en los 15 kg/ha a partir del año 12 de la plantación. Se debe insistir que no hay absoluta seguridad en la producción, hay plantaciones que no producen nada, o prácticamente nada (Los fracasos en las plantaciones habría que analizarlos uno por uno, además muchas veces se han realizado trabajos poco coherentes). De cualquier forma si se utiliza planta micorrizada de calidad, terreno y climas adecuados y cuidados culturales bien dirigidos, la producción se podría asegurar para más de un 95% de los casos (Reyna, 2000).

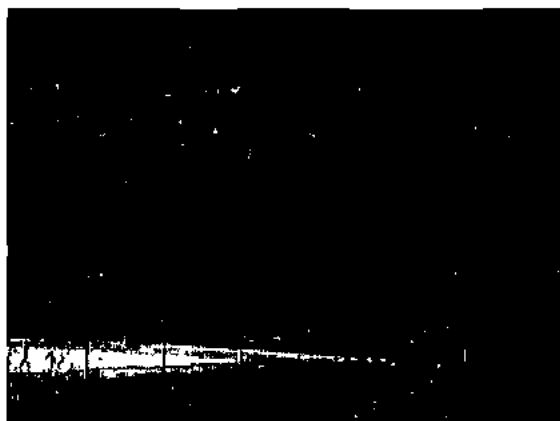


Fig. 5. Plantación trufera en Navarra, España.

Aunque en Europa se han desarrollado las técnicas para el cultivo artificial, la producción silvestre ha caído drásticamente en los últimos 100 años, disminuyendo desde 1000 ton. al comienzo del siglo XX a alrededor de 100 ton. hoy en día, por lo cual la demanda de este producto ha aumentado considerablemente.



Se señala para Francia una producción de tan solo 10 Ton. En 1992. Los motivos de este declive se atribuyen a la modificación del medio rural, la expansión de los bosques y los ataques de plagas durante la Primera y Segunda Guerra Mundial. Este descenso en la producción Francesa se produce a pesar de que las plantaciones con planta micorizada comienzan bastante antes que en España, pero tampoco parece que, por el momento, han podido compensar los descensos de la producción natural (Reyna, 2000).

## Aspectos Comerciales

### Producto

Una desafortunada tendencia en la industria internacional de la trufa es el aumento de la sustitución de *Tuber melanosporum* con trufas de menor calidad tal como: *T.brumale*, *T.uncinatum*, *T.indicum*, *T.sinense* y *Tuber himalayense*. La diferencia de precio, la cual está en función de las cualidades organolépticas y el suministro son las fuerzas que motivan este aspecto indeseable de la industria.

Un ejemplo de esto es el mercado de trufas de origen Asiático (*T.indicum*, *T.sinense* y *Tuber himalayense*). Estas trufas procedentes principalmente desde China tienen muy poco valor culinario y por ende un precio mucho más bajo. El problema radica en que estas trufas están siendo utilizadas por algunos comercializadores y compañías procesadoras obteniendo cuantiosas ganancias financieras ya que éstas son muy difíciles de diferenciar morfológicamente de *T. melanosporum*. Por ejemplo, en productos tales como el foie gras, procesadores de alimentos para gourmet usan estas trufas chinas en trozos o enteras y le adhieren esencias sintéticas de trufa negra como aromatizante. Un etiquetado engañoso hace pasar estos productos como productos de *Tuber melanosporum* con valor agregado los cuales logran muy altos precios. También sucede lo mismo con productos en conserva, en los cuales se usan también las trufas chinas y estas son aromatizadas con productos sintéticos o con licor preparado con *Tuber melanosporum*. En el mercado de producto fresco, una trufa (*T.melanosporum*) es usada para imbuir 1 Kg de trufa china con su aroma característico, el cual es perdido inmediatamente después del proceso de cocción. (Stahle y Ward. 1996).

Existen diferentes productos de *Tuber melanosporum*, uno de estos es la trufa negra entera y en fresco, la cual se vende embalada de diferentes formas según la distancia de envío y el cliente/mercado quién recibe el producto. Normalmente se embala dando una apariencia rústica, lo cual es muy considerado. Para esto se usan paja y canastos plásticos o en pequeñas cajas de madera selladas en plástico. Debido a su fuerte aroma y su alto precio las trufas son mayormente usadas como condimentos por los chefs y gourmets en trozos muy finos. Cualquier plato condimentado con trufa como mínimo dobla el precio de un plato normal en Europa.

Otros productos son las trufas en conserva las cuales son usadas principalmente en el mercado fuera de temporada en Europa (Marzo a Diciembre), donde el producto fresco no está disponible. La venta y consumo fuera de estación, de trufas en conserva constituye alrededor del 60% del volumen de mercado de trufas consumidas. (Reyna, 2000). También existen otros productos derivados de trufas, tal como el foie gras, terrines, aceites, pastas y salsas, donde *T.melanosporum* es utilizado como aromatizante y condimento. Todos estos productos derivados y en conserva alcanzan aún mayores precios, en comparación al producto fresco.

### Demanda

La demanda por *T. melanosporum* y otras trufas ha aumentado considerablemente desde la última parte del siglo XX. La combinación entre el aumento de la demanda y la caída de la producción ha provocado que se mantengan altos precios para este producto. Es interesante apuntar que en años de real escasez el precio promedio no aumenta necesariamente. Esto se debe principalmente a las condiciones subóptimas lo que resulta en una baja calidad de trufas.

Debido a que casi el total de la producción mundial proviene de Francia, España e Italia, el total producido por estos países puede ser usado para estimar el tamaño del mercado mundial. Sin embargo es muy difícil estimar la demanda debido a la falta de información fidedigna y la poca transparencia de los mercados principalmente en España e Italia, además existe un gran secretismo en el sector.

La producción mundial de trufas es una cifra desconocida y los valores que se entregan deben tomarse con cautela, se calcula que Francia produce alrededor de 150 Ton/año, Italia 100 y en España las cifras oscilan entre 50 y 90 Ton/año. (Vilas, 1999).

La producción de trufa silvestre se reduce cada año por causas mencionadas anteriormente, por lo cual se necesitarán producciones para abastecer el mercado, que solo podrán venir de las plantaciones, por ello a diferencia de otros sectores, el futuro pasa por producir más, pues el mercado absorbería mayores producciones sin ningún problema, manteniendo precios altos, de hecho Francia podría absorber mayores cantidades de trufa, sin tener en cuenta que existen potenciales mercados de alto poder adquisitivo como U.S.A. y Japón.

### Precios

Desde año a año, los precios pagados a truficultores varían debido a la disponibilidad y calidad de las trufas. Por ejemplo en España, Los precios aproximados del kilogramo de trufa fresca en los últimos años han sido los siguientes:

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| Años 70:         | 6-30 US\$/kg     |
| Años 80:         | 30-129 US\$/kg   |
| Años 90-95:      | 162 US\$/kg      |
| Campaña 95-96:   | 189 US\$/kg      |
| Campaña 96-97:   | 54-162 US\$/kg   |
| Campaña 97-98:   | 43 y 162 US\$/kg |
| Campaña 98-99:   | 162-460 US\$/kg  |
| Campaña 99-2000: | 500 US\$/Kg      |

Por otro lado en Francia, los precios que alcanza el producto suele estar al menos un 50% más que en España, donde la temporada 2001-2002 los precios pagados a truficultores han alcanzado los US\$600 a US\$700 /kg.

Una oferta de trufa fresca fuera de temporada desde el hemisferio sur debiera lograr en Europa un precio superior a 500 US\$/Kg, dependiendo de la disponibilidad y calidad. La producción de trufa fresca contra temporada competiría por precios directamente con la trufa en conserva usada en Europa, sin embargo la calidad es muy superior.

### Comercialización

Tradicionalmente, la distribución de trufas fué iniciada por truficultores, quienes entregaban en mercados claves tales como Lalbenque, Carpentras, Richerenches, Valréas y Aups en Francia. En estos mercados, agentes, Propietarios de Restaurants, Distribuidores y Gourmets compran directamente a los vendedores siendo las transacciones con pago en efectivo. El producto fresco es presentado en canastos, no permitiéndose la manipulación de las trufas y el comprador solo puede ver la apariencia y oler el aroma del producto.

Por otra parte en otros países fuera de Europa, donde no existen mercados tradicionales, las trufas importadas o las pequeñas cantidades cultivadas localmente (Ej: Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia) son normalmente manejadas por Empresas de alimentos para gourmets.

A nivel internacional el comercio de trufas está controlado casi totalmente por Francia, absorbiendo prácticamente toda la producción española y parte de la italiana.

En España el sector trufero está en pleno auge, debido en parte a que es uno de los mayores productores mundiales. El comercio se realiza entre buscadores e intermediarios que compran para exportadores, aunque estos últimos también compran directamente a los buscadores. En Italia también ocurre algo parecido, ya que la exportación está totalmente controlada por muy pocas empresas, incluso la importación en Italia, se puede decir que está controlada por una sola empresa, como es Urbani Tartufi (Hall et. Al, 2001)

La mayor parte de la comercialización en España es realizada en su totalidad por nueve empresas siendo las comunidades de Valencia y Cataluña las que más volumen de comercialización registran (Reyna, 2002).

#### Posibles barreras comerciales

Según Pebeyre, 2001, existe alto interés en una posible producción de trufa negra en Chile, ya que podría generarse una oferta interesante del producto contra temporada en Francia, lo cual es visto como complementario a su mercado.

De hecho en Australia, la empresa Perigord Truffles of Tasmania (PTT), desde 1996 ha emprendido una extensiva investigación sobre el potencial para comercializar trufas fuera de temporada en Europa. Como resultado de sus contactos y discusiones con mayoristas y detallistas en Francia e Inglaterra, el concepto de una producción en el hemisferio sur, resulta de gran interés en todos los niveles del negocio. Con la continua disminución de la producción natural de trufas en Europa, La entrada de Tasmania al mercado en los próximos años es vista como complementaria a la industria Francesa y no en forma competitiva a su mercado (Cooper, P. 2001).

Por otra parte los mercados asiáticos son de gran interés para comercializar este producto, pudiendo consumir toda una posible producción de Chile. De hecho, de acuerdo a cifras de un informe de JETRO, 2000 (Japan External Trade Organization) la importación de trufa fresca en Japón en las temporadas de producción del hemisferio norte se ha ido incrementando año a año, variando alrededor de 5 Ton en 1994 a 10 Ton en 1998 en el mercado mayorista. Además, existe un enorme oportunidad para exportar trufa en fresco a Japón contra temporada, ya que el suministro en los meses de verano se basa en productos de trufa en conserva de inferior calidad gastronómica y en pequeñas cantidades, las cuales logran precios muy altos.

En cuanto a aranceles de importación en Japón, para las trufas (Código arancelario HS 070952) se aplica una tasa general de 5% y un 3,3% de acuerdo a reglas de la Organización Mundial de Comercio (OMC) (JETRO, 2000). Sin embargo, nuestro país pertenece a la APEC, por lo cuál prontamente deben concretarse acuerdos que favorezcan nuestras exportaciones a Japón, incluyendo beneficios arancelarios.

Los principales requisitos para el ingreso de trufas a Japón son de tipo sanitario. Las importaciones de hongos frescos en general son controladas bajo la Ley de Protección de Plantas, Ley de Sanidad de Alimentos, Ley de Estandarización y Etiquetado de Productos Agrícolas y Forestales (Ley JAS) y Ley de Asuntos Farmacéuticos, dependiendo del uso y tipo de hongo.

Las trufas no se producen en Japón, ellas son importadas principalmente de China, Francia e Italia en las temporadas de producción del hemisferio norte. En el caso de la trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) el producto fresco es transado solamente en los meses de invierno del hemisferio norte, no habiendo suministro en los meses de verano.

Otro mercado de gran interés para este producto (Código HTS 070952) es el Norteamericano, sin embargo sus importaciones son bajas en relación al consumo interno de Francia, País que absorbe prácticamente toda la

producción mundial. Esto nos da una idea del gran potencial que tiene la exportación de trufas contra temporada a Europa, Japón y USA, es decir en los meses de verano del hemisferio norte, cuando no se dispone del producto en fresco. Por esta razón difícilmente podrán presentarse barreras de tipo arancelarias o para-arancelarias, ya que una posible oferta del producto en fresco desde Chile sería complementaria a sus mercados tradicionales.

En cuanto a las regulaciones del mercado Norteamericano, son al igual que Japón y Europa de tipo sanitarias, sin embargo son barreras normales, las cuales se aplican en general a las importaciones de hongos comestibles. En USA, las regulaciones para las importaciones de hongos son normadas por la FDA (U.S. Food and Drugs Administration), las cuales son similares a las aplicadas en Japón. Los aranceles, para el caso de U.S.A., según informe de US International Trade Commission, 2001; el Programa Armonizado de Tarifas (HTS), para el caso de trufas en fresco (Código HTS 070952), no aplica tasas arancelarias al producto, lo cual es muy ventajoso.

Según Reyna, 2002; en Europa no existen barreras de entrada al producto, salvo que específicamente se prohíba su entrada, lo cual no es el caso para las trufas. Solamente existen barreras de tipo sanitarias, aplicables en general a los hongos comestibles. Actualmente, Sólo Nueva Zelanda y Australia están produciendo trufas provenientes de plantaciones en el hemisferio sur, por tanto se vislumbra un mercado interesante para exportar contra temporada al hemisferio norte, principalmente Francia, USA y Japón.

Nuestro país podría competir directamente con Nueva Zelanda y Australia, donde su producción está recién comenzando. Sin embargo su oferta es pequeña como para ser una amenaza, además la demanda actual y proyectada en los mercados del hemisferio norte va en constante aumento debido a la drástica caída que ha tenido la producción natural en Europa, la cual se ha visto agravada por problemas de contaminación ambiental y degradación de las truferas naturales.

Cabe destacar que la ubicación geográfica de Chile, se presenta como una ventaja comercial al permitir ofrecer el producto en fresco, durante el período contra-temporada de Europa, ya que la época de cosecha es exclusivamente durante otoño/invierno, por esta razón, una oferta desde Chile podría lograr precios entre 400 y 900 US\$/Kg, dependiendo de la disponibilidad y calidad (Reyna, 2002).

## CONCLUSIONES

Se puede concluir que existe una excelente oportunidad para establecer y desarrollar el cultivo de trufa negra como una alternativa productiva y de negocio para el sector silvoagropecuario en Chile. Los puntos claves son los siguientes:

### Consideraciones técnicas:

- Chile presenta una gran diversidad edafoclimática, lo cual podría asegurar en gran medida, que las condiciones de suelo y clima adecuados para la trufa, pueden ser encontradas en la zona centro-sur del país, especialmente donde la precipitación natural puede ser complementada mediante irrigación.
- Chile presenta una flora única con solo unas pocas especies formando ectomicorizas, principalmente especies del género *Nothofagus* y algunas otras especies nativas. La expansión de plantaciones industriales como el pino radiata y eucaliptus, podría aumentar la incidencia de hongos ectomicorrícicos, los cuales pueden competir con nuevas especies introducidas, pero aún hay muchas áreas donde la flora fúngica es escasa o nula, principalmente en suelos utilizados por la agricultura tradicional.
- Existe una buena oportunidad para desarrollar el cultivo y producción de trufa negra en Chile, basado en la tecnología disponible, su adopción en nuestro país y el desarrollo de esquemas de control que aseguren la calidad de la producción.
- El establecimiento y desarrollo de la truficultura en Chile debiera ser capaz de evitar la contaminación y sustitución de *Tuber melanosporum* por especies sin interés comercial, mediante acciones preventivas y controles estrictos del proceso productivo.

### Consideraciones económicas:

- Producir trufa negra en Chile, otorga una excelente oportunidad de negocio para el sector silvoagropecuario, especialmente para la reconversión de la agricultura tradicional, donde ésta ya no presenta una adecuada rentabilidad.
- Existe en Chile la oportunidad de producir *Tuber melanosporum* fresco, contra temporada, donde el producto estaría disponible aproximadamente desde junio a agosto. Una producción en Chile no afectaría el tradicional y bien establecido mercado de la trufa fresca en el hemisferio Norte, el cual normalmente funciona desde diciembre a marzo.
- Existe un casi ilimitado potencial de mercado para una oferta de trufa fresca desde Chile, como un sustituto vastamente superior a las trufas en conserva usadas en Europa, Asia y USA, las cuales logran precios muy altos.
- Para proteger sus intereses, los mercados europeos de trufa en conserva podrían poner resistencia al ingreso de trufa fresca desde Chile. Incluso si tales barreras fueran exitosas, los mercados asiáticos podrían consumir toda una posible producción desde Chile.

- Nuestro país podría competir directamente con Nueva Zelanda y Australia, donde su producción esta comenzando ahora. Sin embargo su oferta es pequeña como para ser una amenaza, además la demanda actual y proyectada en los mercados del hemisferio norte va en constante aumento debido a la drástica caída que ha tenido la producción natural en Europa.
- El tiempo requerido para establecer la producción comercial de trufa en Chile y las distintas rentabilidades que se pueden lograr, indican la necesidad de establecer un sistema productivo en tres etapas separadas, con tres separados y posiblemente interdependientes grupos de beneficiarios: inoculación, cultivo en campo y comercialización.
- La etapa de inoculación y establecimiento, la cual es la menos rentable pero a la vez la más crítica etapa, para una producción comercial en Chile, requiere de apoyo del gobierno e instrumentos de financiamiento, que faciliten la incorporación al sistema productivo nacional.
- Para proteger la integridad de una industria y asegurar la producción de trufa con calidad certificada, será crítico disponer de un proceso de inoculación capaz de garantizar la calidad de los árboles que se distribuyan a los agricultores junto con la información necesaria y una adecuada asistencia técnica. De otra forma un producto de inadecuada calidad podría ser antieconómico para los agricultores.

## REFERENCIAS

- Bencivenga, M., 1999. "Experiencias italianas en truficultura: Problemática, Perspectivas y Expectativas". En " 1as Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón". Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.
- Bonet J. y Colinas, C. "Cultivo de trufa negra" en "Cultivo de Hongos comestibles micorrícicos", Actas Jornadas LIFE. URL: <http://labpatfor.udl.es/docs/cultivotrufa.html>
- Chevalier, G., 1998. "The truffle cultivation in France: Assesment of the situation after 25 years of intensive use of mycorrhizal seedlings" In "First International Meeting on "Ecology, Phisiology and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushroom", Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Cooper, P., 2001. "Comunicación personal". Perigord Truffles of Tasmania (PTT). Tasman Highway GROVE TAS 7109 Tasmania, Australia.
- Hall, I., Brown, G. and Byars, J. 2001". The black truffle: its history, uses and cultivation". New Zealand Ministry of Agriculture & Fisheries. 107 pp. Second Edition.
- JETRO, 2000. "Japanese Market Report. Mushrooms-Regulations and Practices". Japan External Trade Organization.
- Lefevre, C. y Hall, I. 2001. The status of truffle cultivation. A global perspective. In "Proceedings of the Fift International Congress on Hazelnut" Acta Horticulturae Number 556. Editor S.A. Mehlenbacher.
- Morcillo, M. 2000. Comunicación personal. "Empresa Micología Forestal y Aplicada", Barcelona, España.
- Palazón, C., Delgado, I., Bamuso, J. 2000. "Instalación de truferas artificiales. Requerimientos y posibilidades de cultivo". En "1as Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón". Ediciones Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.
- Pebeyre, P. J., 2001. "Comunicación personal". Director, Pebeyre S.A. Truffes, Cahors, France.
- Perrin, R., 1999. "La experiencia truficola francesa" En "1as Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón".Ediciones Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.
- Reyna, S., 2002. "Comunicación personal". Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM), Valencia, España.
- Reyna, S., 2000. "Trufa, Truficultura y Selvicultura Trufera". Ediciones Mundiprensa, Madrid 229 pp.
- Reyna, S. 1999. "Aproximación a una selvicultura trufera". Tesis Doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad politécnica de Madrid.
- Saez, R. y De Miguel, A., 1995. "Guía Práctica de Truficultura. ITG Agrícola. Universidad de Navarra, España.
- Stahle, P. & Ward, D., 1996. " Evaluation of The Potential of Growing *Tuber melanosporum* as a Crop on Mainland Australia for Export And Domestic Consumption". A Study by DPS Strategy Pty Ltda. Rural Industries Research and Development Corporation, Project Nº DPS-1A.
- Tirado, G., 2000. "Comercialización de la Trufa". En "Jornadas de Truficultura, Viver, El Toro, Castellón". , España, Octubre del 2000.
- U.S.A. International Trade Comission, 2001. "Harmonized Taniff Schedule of the United States (2001)- Supplement 1 (Rev.1). Chapter 7. Edible Vegetables and Certain Roots and Tubers.
- Vilas, A., 1999. "Introducción a la truficultura. Situación actual". En "1as Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón". Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.



## INFORME ANEXO 1.3.

### ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL PH, COMPETENCIA DE OTROS HONGOS Y ENMIENDAS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE *Tuber melanosporum* EN CHILE.

#### SITUACIÓN EN EUROPA

Las experiencias desarrolladas en Europa en plantaciones artificiales de trufa negra, desde los años 70 hasta hoy en día, muestran resultados muy variables en la producción.

La mayoría de las plantaciones se establecen alrededor de áreas productoras de trufa natural para tratar de ajustarse al máximo a las condiciones de suelo y clima que favorecen el desarrollo del hongo.

Los suelos donde se desarrolla la trufa negra de forma natural en Europa, son calcáreos de 10-40 cm de profundidad del tipo rendzina, calcosoles y calcisoles. El pH de estos suelos varía dentro de los rangos 7.5 a 8.5. (Reyna, 2002).

Hasta la fecha, en Europa la truficultura como tal ha sido planteada para las zonas donde se produce trufa en forma natural. No existen experiencias en suelos ácidos, a diferencia de las plantaciones establecidas fuera de Europa.

El pH del suelo es considerado uno de los factores más importantes de cara al desarrollo y fructificación de *Tuber melanosporum* en plantaciones artificiales. El problema en Europa radica en que las plantaciones se establecen en suelos naturalmente calcáreos con pH dentro de rangos 7.5 a 8.0, los cuales son adecuados para la trufa negra. Sin embargo, la gran diversidad de hongos de ectomicorriza adaptados a este tipo de suelos produce problemas serios de competencia, lo que afecta negativamente el desarrollo y fructificación de *Tuber melanosporum* en Europa.

El problema es más grave, ya que las principales especies de hongos de ectomicorriza que compiten con la trufa negra en los suelos europeos pertenecen al mismo género (*Tuber* sp.) y dentro de estas especies competidoras, existen varias que son francamente calcícolas, adaptadas a rangos de pH entre 7.5 y 8.5. y además son capaces de infectar naturalmente las mismas especies huésped. Ej. *Tuber brumale*, *Tuber aestivum*, *Tuber maculatum*, *Tuber rufum*, *Tuber dryophilum*, etc. (Reyna, 2002).

La competencia de otros hongos de ectomicorriza con *Tuber melanosporum* en los suelos de cultivo en Europa es muy agresiva (es una verdadera guerra bajo el suelo), provocando muchas veces en campo, el desplazamiento de la asociación simbiótica producida artificialmente en invernadero.

Según opiniones de expertos en Europa, la competencia de otros hongos de ectomicorriza, principalmente del género *Tuber*, es el principal factor que impide mayores avances en la experimentación con plantaciones trufas artificiales en los suelos de cultivo europeos, que en su mayoría son calcáreos (Hall, I. 2001).





#### EXPERIENCIAS Y RESULTADOS FUERA DE EUROPA

Según el experto Ian Hall (2002), quién ha desarrollado la tecnología para cultivar la trufa en Nueva Zelanda, de las 8 plantaciones comerciales que están produciendo actualmente fuera de Europa (Nueva Zelanda, USA y Tasmania), 7 se encuentran sobre suelos con pH natural ácido a neutro (5,9 a 7.0) que han sido enmendados con cal para subir el pH.

Según Lefevre (2002), en USA existen sólo 2 plantaciones comerciales que producen trufa y ambas han sido establecidas sobre suelos naturalmente ácidos que han sido enmendados con cal. Dos grandes plantaciones establecidas sobre suelos calcáreos en Estados Unidos han fallado debido a la competencia de otros hongos de ectomicorriza.

Los buenos resultados obtenidos a la fecha en plantaciones en el hemisferio sur y en USA, sobre suelos ácidos, indican que la competencia de hongos de ectomicorriza que habitan en estos suelos se ve minimizada al ser enmendados con cal, lo que ha favorecido el desarrollo y fructificación de *Tuber melanosporum*, Vitt.

#### PERSPECTIVAS PARA CHILE

Nuestro país presenta una flora única, con sólo algunas especies que forman ectomicorrizas, principalmente especies del género *Nothofagus* y algunas otras especies nativas en suelos ácidos. La expansión de plantaciones industriales como el pino radiata y *eucaliptus*, podría aumentar la incidencia de hongos ectomicorrícicos, los cuales pueden competir con nuevas especies introducidas, pero aún hay muchas áreas donde la flora fúngica es escasa o nula, principalmente en los suelos utilizados por la agricultura tradicional donde los hongos encontrados, debieran tener poca capacidad para competir con la trufa al realizar enmiendas con cal y subir el pH.

En opinión de Lefevre (2002), de acuerdo a las experiencias en USA, mejores resultados se obtendrán en Chile sobre suelos ácidos enmendados con cal y además se obtendrá mayor éxito, usando en las plantaciones, especies huéspedes introducidas, ya que la mayoría de los hongos nativos tendrán poca capacidad para formar ectomicorrizas con especies del hemisferio norte como *Quercus ilex*, *Quercus robur* y avellano europeo (*Corylus avellana*).

Según nuestro punto de vista y las opiniones de expertos pensamos que en el proyecto debiéramos seleccionar sitios con pH de 6.0 hasta 6.7, los cuales además, podemos encontrar en las zonas climáticamente más adecuadas para la trufa en nuestra región. Aunque existen también en estas zonas, pH bajo 5.9, estos debiéramos descartarlos por los problemas que se pudieran generar en cuanto a fijación de la cal en el suelo.

En opinión de Reyna (2002), en plan práctico para el proyecto debiéramos enmendar los suelos aplicando cal fina para subir el pH y luego aplicaciones de cal con una granulometría más gruesa (Arena y gravilla caliza).



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

Como conclusión, creemos que sería adecuado plantar truferas en este tipo de suelos ya que al subir el pH mediante enmiendas y mantener condiciones adecuadas para la trufa podríamos limitar la competencia con otros hongos de ectomicorriza, ya sea nativos como introducidos en forma accidental, favoreciendo el desarrollo y posterior fructificación de *Tuber melanosporum*, en plantaciones artificiales establecidas en suelos agrícolas en Chile.

#### REFERENCIAS

- 1) Hall, Ian, 2002. Comunicación Personal. "Truffle Team Leader, Crop & Food Research Invermay Agricultural Centre, Private Bag 50034, Mosgiel, New Zealand".  
e-mail: [halli@crop.cri.nz](mailto:halli@crop.cri.nz)
- 2) Lefevre, Charles, 2002. Comunicación Personal. "North American Truffle Society Department of Forest Science, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, USA".  
e-mail: [charles.lefevre@orst.edu](mailto:charles.lefevre@orst.edu)
- 3) Reyna, Santiago, 2002. Comunicación personal, Fundación CEAM, Parque Tecnológico C/Charles R. Darwin, 14, Valencia. España. E-mail: [santiago@ceam.es](mailto:santiago@ceam.es)



INFORME ANEXO 1.4.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE GIRA TÉCNICA A ESPAÑA

SEGUNDA PARTE

**2.2 SE CONOCIERON EXPERIENCIAS DE CAMPO Y PRINCIPALES ASPECTOS DE PRODUCCIÓN EN PLANTACIONES TRUFERAS ESPAÑOLAS.**



Foto 1. Plantación de *Quercus flex* con 4 años de edad, aún sin producción (El Toro, Castellón)

El aprovechamiento de bosques naturales para la producción de trufa negra ha sido tradicionalmente una fuente importante de ingresos en el sector rural de los principales países productores, como Italia, Francia y España. Sin embargo, la desaparición paulatina de las trufas naturales y la creciente demanda del mercado hacia este producto han estimulado la creación de plantaciones artificiales, sobre todo a raíz de la política de la PAC (Política Agraria Comunitaria) que estableció subvenciones importantes para las actividades de reforestación.

Tanto en Italia como en Francia, países con una gran tradición y cultura en torno a la trufa, la truficultura propiamente tal no se consolidó hasta las décadas de los 70-80, momento en el que se consiguió la producción de planta micorrizada a gran escala. En España la instalación de trufas artificiales no se empezó a contemplar hasta hace 10-15 años, con excepción de la plantación de AROTZ-CATESA en Villaciervos (Soria), con una extensión de aproximadamente 700 ha., la cual actualmente tiene una edad de 30 años y se mantiene en plena producción.

**PLANTACIONES TRUFERAS EN ESPAÑA**

En España las plantaciones trufas comenzaron a realizarse después que en Francia e Italia. Actualmente en España las tasas de plantación han aumentado considerablemente, por ejemplo para 1999 se estimaba una superficie plantada de alrededor de 1300 ha en España.

Actualmente, la zona española con mayor superficie plantada y con mercado liderazgo en el sector corresponde a la zona de contacto entre Castellón y Teruel (El Toro, Barracas, Sarrión, Mora, Morella, etc.). Solo en Teruel existen hoy en día más de 700 ha. plantadas. Además en esta zona se concentra el mayor número de viveristas que producen planta micorrizada y el mercado trufero más importante de España.

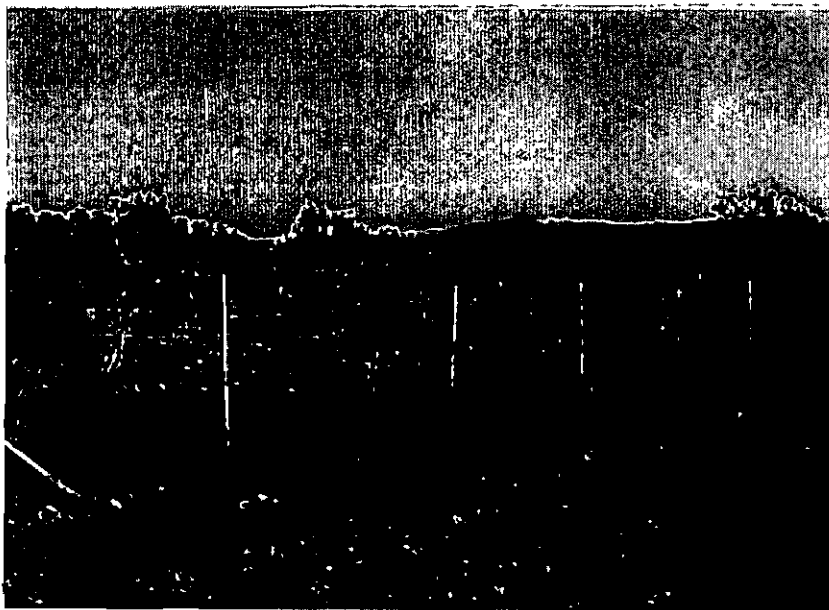


Foto 2. Plantación trufera de 29 años de edad en plena producción (El Toro, castellón)

En general en España la principal especie huésped, usada para plantaciones truferas es la encina (*Quercus ilex* spp. *ballota*). Su elección reside principalmente por ser la principal especie productora en bosques naturales, además es una especie muy adaptada a las condiciones agroecológicas de la península ibérica. A diferencia de Francia donde la principal especie trufera es el roble francés (*Quercus pubescens*) y el avellano europeo (*Corylus avellana*).

En general en las plantaciones europeas hechas con plantas micorrizadas, la producción no suele comenzar antes de los 6-10 años. Los datos referentes a producciones por hectárea son muy variables y desgraciadamente no se puede asegurar 100% los resultados como sucede en los cultivos tradicionales.

En España, existen plantaciones con riego, con producciones regulares y constantes próximas a 100 kg/ha/año y por el contrario otras que apenas superan los 10 kg/ha. En plantaciones sin riego la variabilidad es mayor, donde en los mejores años se superan los 120 kg/ha y los peores no llegan a 2kg/ha. En general los datos de producción media más utilizados se sitúan entre los 20 y 50 kg/ha/año.

Uno de los problemas de las plantaciones españolas es la disponibilidad de agua para riego, por tal razón las plantaciones se establecen generalmente sin instalaciones de riego y quedan dependiendo de las condiciones climáticas imperantes de cada zona. Esta es una de las principales causas de las grandes variaciones anuales de la producción en plantaciones españolas.

En general las plantaciones se establecen alrededor de áreas productoras de trufa natural para ajustarse al máximo a las condiciones que favorecen el desarrollo del hongo.

Las principales limitaciones para implementar sistemas de riego en las truferas son la escasez de cursos naturales de agua en estas áreas, con un clima seco, y por otra parte la implementación de pozos profundos y estanques de acumulación se hace muy caro para un agricultor normal. Para plantaciones con riego en España, desde el punto de vista financiero, el límite de rentabilidad económica estaría en los 15 kg/ha a partir del año 12 de la plantación.



A modo de ejemplo, la empresa AROTZ-CATESA en Villaciervos (Soria), ha implementado instalaciones de riego en sus plantaciones truferas para regar una superficie de 200 ha. Para esto ha debido construir un pozo para extraer agua subterránea a una profundidad de 150 m.

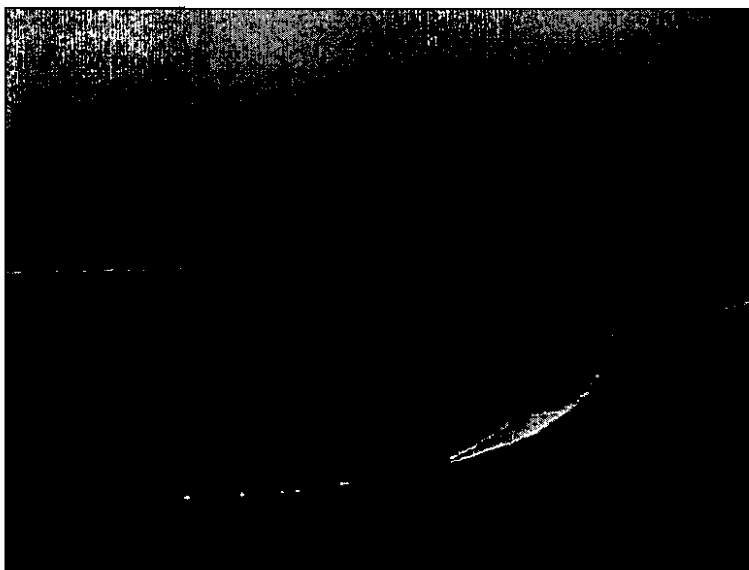


Foto 3. Estanque de acumulación de agua para riego (Arotz-Catesa, Soria)

Según el gerente de operaciones de la empresa Arotz-Catesa, existe en total una superficie plantada de alrededor de 700 ha., de las cuáles sólo las que poseen riego presentan producciones de trufa regularmente (200 ha.), promediando la producción anual en alrededor de 40 Kg de trufa por hectárea.

Esta plantación es actualmente la más grande del mundo y sus operaciones al parecer seguirán expandiéndose.



Foto 4. Equipos utilizados para riego (Arotz-Catesa, Soria)

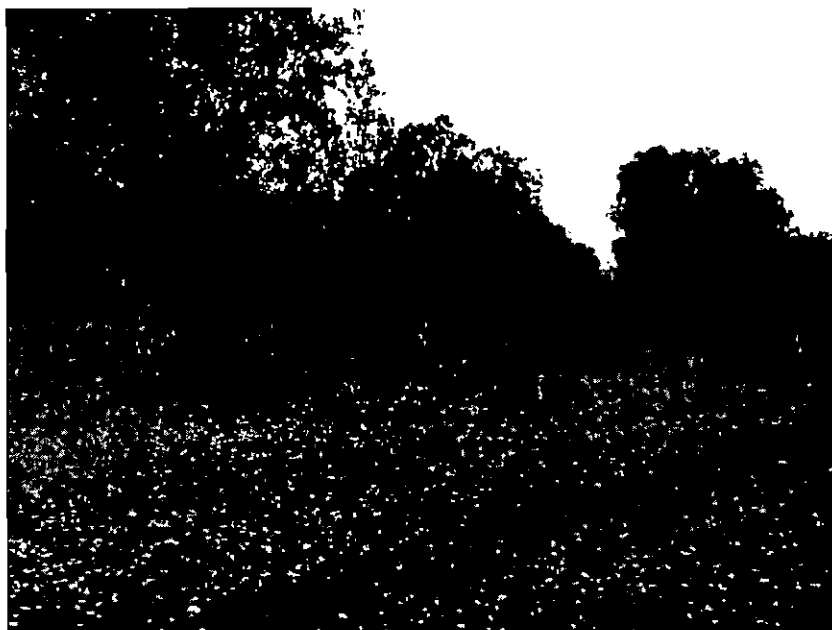


Foto 4. Plantaciones truferas de encina de la empresa AROTZ-CATESA (Soria)

Otro aspecto de interés en España para el establecimiento de plantaciones truferas es la elección del marco de plantación y densidad de plantación. Esta decisión tiene una gran influencia en los resultados en las plantaciones españolas, variando según la especie utilizada como huésped y las condiciones agroclimáticas. En relación a los resultados obtenidos hasta hoy en España, se recomiendan los siguientes marcos de plantación:

| <b>Marcos de plantación sugeridos según especies y tipo de cultivo</b> |                                            |                    |                                            |                    |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|--------------------|
|                                                                        | <b>Sin riego</b>                           |                    | <b>Con riego</b>                           |                    |
| <b>Especie</b>                                                         | <b>Superficie<br/>m<sup>2</sup>/planta</b> | <b>Marcos m</b>    | <b>Superficie<br/>m<sup>2</sup>/planta</b> | <b>Marcos m</b>    |
| <b>Encina</b>                                                          | 30 a 50                                    | 6x5 6x6<br>6x7 7x7 | 25 a 35                                    | 5x5 5x6 6x5<br>7x5 |
| <b>Avellano</b>                                                        | 20 a 30                                    | 4x5 5x5<br>6x5     | 20 a 25                                    | 4x5 5x5            |
| <b>Roble y<br/>quejigo</b>                                             | 30 a 60                                    | 6x5 6x6<br>6x7 7x7 | 30 a 50                                    | 6x5 6x6 6x7 7x7    |

Al igual que en la mayoría de las plantaciones comerciales en Europa, en España las cosechas de trufas se llevan a cabo con la asistencia de perros especialmente adiestrados para detectarlas ya que estas fructifican bajo la superficie del suelo (hongo hipógeo) y son ubicadas gracias al fuerte aroma que emiten cuando están maduras.



Foto 5. Cosecha de trufas con la ayuda de un perro adiestrado (El Toro, Castellón)

Hasta hoy en día, la utilización de perros truferos, es la forma más conveniente para detectar y recolectar las trufas. La forma de adiestrar al perro no tiene ninguna complicación, es preferible entrenarlos desde jóvenes y especialmente para la búsqueda de trufas.

En Europa se utilizan bastante perros pastores especialmente entrenados, aunque este puede ser de cualquier raza y tanto hembras como machos. Se considera que el rendimiento promedio de un perro es para trabajar en 2 ha. durante la campaña de producción.



Foto 6. Detalle de cosecha de trufas con ayuda de perros pastores adiestrados (Navarra)

Actualmente en Francia se están desarrollando sensores electrónicos de aromas, se trata de aparatos aún en fase experimental basados en análisis de gases, la funcionalidad no está plenamente comprobada y su precio es muy alto. Por el momento este sistema no parece recomendable.



La productividad en plantaciones truferas tanto en España como en Francia e Italia son muy variables y los resultados no son asegurables en un 100%. Las experiencias muestran que plantas de la misma calidad en cuanto a su nivel de micorrización, establecidas en distintos ambientes y cultivadas en distinta forma arrojan resultados diametralmente opuestos.

En general, en España los mejores resultados de producción en plantaciones se están obteniendo con planta micorrizada de *Quercus ilex*, producida por viveros ubicados en las mismas zonas donde se establecen las parcelas.

Por otro lado, las técnicas de cultivo que se utilizan en general en España, se aplican igualmente para distintas condiciones agroclimáticas locales, lo que al parecer es uno de los factores que afecta negativamente los resultados en las plantaciones.

Como ejemplo, dentro de las experiencias visitadas en Soria, una plantación trufera donde se utilizó en parte planta micorrizada de avellano europeo y encina procedentes de viveros franceses (Foto 7), actualmente estos árboles no presentan producción de trufas, sin embargo los árboles micorrizados de encina procedentes de viveros de la zona están en plena producción de trufas.



Foto 7. Plantación mixta avellano, encina y quejigo (Valdegeña, Soria)

Una de las experiencias interesantes visitadas en España fue al Servicio de Investigación Agroalimentaria en Zaragoza, donde se trabaja en una plantación experimental que se ha establecido en un suelo que no cumple cabalmente las condiciones para el cultivo, además se encuentra en una zona fuera de las áreas de producción natural en España.





Foto 8. Plantación experimental SIA (Zaragoza)

Hoy en día estas plantaciones tienen una edad de 6 años y aún están sin producir, sin embargo los resultados de seguimiento de los niveles de micorrización en los árboles indican que estaría pronta a producir.

De acuerdo a información proporcionada por el Dr. Carlos Palazón, quién dirige este proyecto, actualmente los mejores resultados se están obteniendo con *Quercus ilex*, especie que mantiene un alto grado de micorrizas de *Tuber melanosporum* en campo, a diferencia de avellano europeo (*Corylus avellana*), especie que presenta un alto grado de contaminación con otras especies de *Tuber*, principalmente *Tuber brumale*, que al parecer ha desplazado a *Tuber melanosporum* en campo.

En este centro actualmente se están llevando a cabo ensayos de enmiendas con cal para favorecer la producción de trufas, además se experimenta con riego y diferentes técnicas de cultivo.



A diferencia de otras experiencias desarrolladas en España, los trabajos desarrollados en este centro, tienden a intensificar el cultivo, mediante el uso técnicas agronómicas (Riego, enmiendas, laboreos, podas, etc.). Los resultados actuales en los niveles de micorrización, indican que los tratamientos aplicados favorecen la consolidación de la simbiosis, además la formación de quemados alrededor de los árboles son un claro indicador de una pronta producción, probablemente el próximo año.

Durante la gira realizada se visitaron también experiencias de plantaciones en Navarra, zona que también produce trufa en forma natural.

Las condiciones climáticas de Navarra, son diferentes a las encontradas en las zonas productoras de más al sur de España. Navarra es una zona productora de trufas que presenta una mayor influencia atlántica en España, junto a algunas áreas del país Vasco (clima templado oceánico, con termotipo colino y ombrotipo subhúmedo). Las características climáticas de estas zonas se acercan más a las encontradas en Francia.



Foto 10. Plantación trufera en Olóriz, Navarra.

Las plantaciones truferas en Navarra son parte de un proyecto piloto formado en conjunto por una cooperativa de agricultores, El Instituto Técnico de Gestión Agrícola (ITGA) y el Departamento de Botánica de la Universidad de Navarra.

En estas experiencias, los mejores resultados se están obteniendo con la utilización en plantaciones de árboles micorizados de avellano europeo (*Corylus avellana*) y encina (*Quercus ilex*) a diferencia de otras zonas en España.



Foto 11. Trufas recién recolectadas en una plantación en Olóriz, Navarra

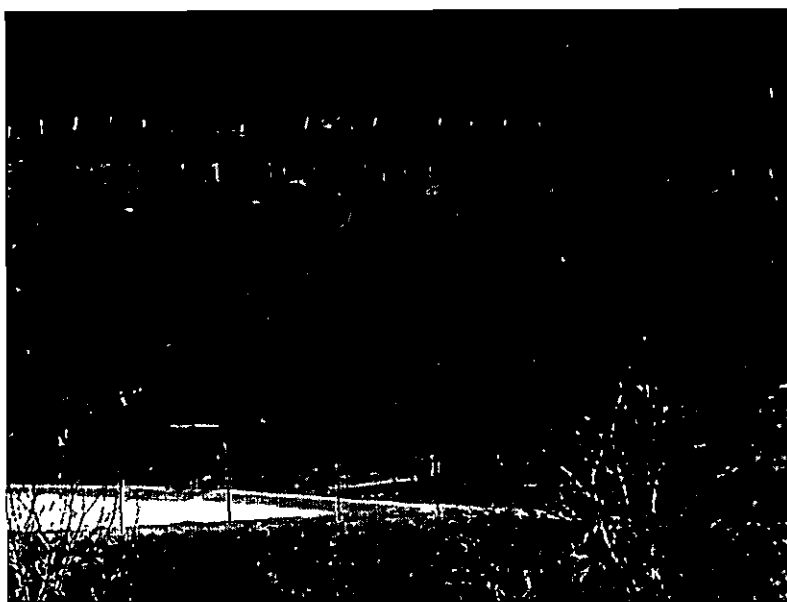


Foto 11. Plantaciones mixtas de avellano, Quejigo y encina con riego (Oloriz, Navarra)

El seguimiento de las plantaciones truferas en Navarra, es realizado por el equipo técnico de la Universidad de Navarra y el ITGA, quienes efectúan muestreos y análisis de micorrizas para conocer la evolución y comportamiento de los cultivos antes de entrar en producción.

La aparición de quemados alrededor de árboles micorrizados con la trufa es un indicador claro de la entrada en producción. Los quemados son producidos por un efecto alelopático producido por la trufa, lo cual suprime el crecimiento de vegetación en la zona de exploración radical de los árboles infectados con el hongo. Este efecto revela superficialmente la actividad subterránea del micelio de *Tuber melanosporum*



Foto 12. Muestreos de micorrizas en un ejemplar de quejigo (*Quercus faginea*)



Foto 13. Muestreos de micorrizas en avellano europeo

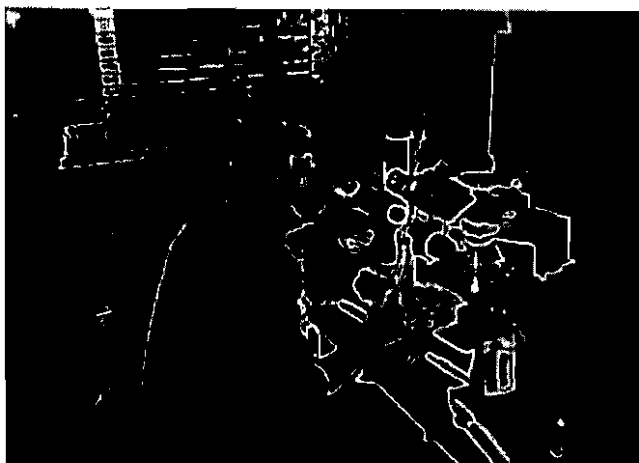


Foto 14. Análisis de micorrizas en laboratorios de Universidad de Navarra



El desarrollo de *Tuber melanosporum* se produce en un medio sumamente complejo como es el suelo de cultivo. La ventaja en la asociación simbiótica producida en invernadero y que da lugar a la planta micorizada producida en los viveros comerciales radica en la utilización de suelos esterilizados o pasteurizados, donde la competencia por parte de otros microorganismos es mínima y donde, siempre que se mantengan condiciones adecuadas de limpieza y protección, el hongo micorrízico no tiene ninguna oposición para acceder a las raíces e instalarse en ellas en una asociación simbiótica duradera.

En España los viveros especializados en este tipo de producto ofrecen planta de alta calidad, adecuada para el establecimiento de plantaciones, lo mismo en Francia e Italia, donde se han generado los mayores avances en la tecnología de inoculación. Sin embargo el establecimiento de las plantas en campo y su posterior manejo al parecer no ha logrado en España y en general en Europa los resultados de producción esperados con el hongo de interés.

Un factor muy importante que limita mayores avances en la experimentación con este cultivo en Europa, es la competencia de otros hongos de ectomicorriza en los suelos donde se establecen las plantaciones, principalmente otras especies del género *Tuber*, las cuáles cohabitan e interactúan entre sí en la mayoría de los suelos de cultivo de origen calcáreo, que es donde se establecen las plantaciones artificiales.

Parte de las experiencias visitadas durante la gira muestran resultados muy variables en las producciones de trufa en plantaciones, lo cual hoy en día es atribuido principalmente a la aplicación de técnicas similares para diferentes condiciones ecológicas y de cultivo, sin considerar las variaciones locales y la elección de las especies simbiotes más adecuadas.

La diversidad de hongos de ectomicorriza en Europa es bastante amplia y existen diferentes especies que son francamente calcícolas, las cuáles se desarrollan bien en rangos de pH entre 7.5 y 8.5, valores muy recurrentes en los suelos de zonas truferas en España, Francia e Italia.

La competencia de otros hongos de ectomicorriza con *Tuber melanosporum* en los suelos de cultivo en Europa es bastante agresiva, provocando muchas veces el desplazamiento de la asociación simbiótica, cuando no se mantienen las condiciones específicas en las cuales *Tuber melanosporum* es más competitivo y finalmente logrará fructificar, objetivo que persigue la truficultura actual.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

**INFORME ANEXO**

1.5

**DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE GIRA TÉCNICA A ESPAÑA**

Proyecto: C01-1-A-85

Entidad Responsable:

Universidad Católica del Maule

Coordinador Proyecto:

Francisco Pérez Muñoz

Lugar (es) donde se desarrolló la Gira (Ciudad, Localidad, Región)

Valencia, Paterna, Quart de Poblet (Valencia), El Toro, Barracas (Castellón), Viver (Castellón), Zaragoza (Aragón), Valonsadero (Soria), Villaciervos, Navaleno (Soria), Pamplona, Olite (Navarra)

Fecha de Ejecución

16 de Enero del 2002 al 1 de Febrero del 2002

Coordinador gira : Santiago Reyna Doménech (CEAM)

Participantes de Chile : Francisco Pérez M.  
Ricardo Ramírez C.

Contraparte CEAM : Santiago Reyna D.  
Laura Folch C.

**1. ITINERARIO DESARROLLADO**

| Día    | Lugar                             | Actividades                                                                                                                                                                                                                                                                       | Contactos establecidos                                                  |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 16 ene | Avión                             | Viaje                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                         |
| 17 ene | Valencia                          | Instalación en hotel en Valencia                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                         |
| 18 ene | Valencia                          | Visita a Fundación CEAM y reunión de trabajo del proyecto.                                                                                                                                                                                                                        | a) M. Millan<br>b) Ramon Vallejo<br>c) Santiago Reyna<br>d) Laura Folch |
| 19 ene | Valencia<br>Castellón<br>Valencia | Visita a Plantaciones trufas, bosques naturales productores de trufa en Castellón (El Toro, Barracas), recolección de trufas para internar a Chile. Reunión con presidente de truficultores de Castellón.<br>Visita a vivero de producción de planta trufera en Viver (Castellón) | e) Eliseo Palomar,<br>f) Jose Luis Carbó,                               |
| 20 ene | Valencia                          | Día libre                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                         |
| 21 ene | Valencia<br>Zaragoza<br>Soria     | Visita Centro Investigación (SIA. Servicio de Investigación Agroalimentaria) en Zaragoza, Gobierno de Aragón. Reunión de trabajo con el Dr. Carlos Palazón, visita a plantación trufera experimental, laboratorios y viveros de producción de planta trufera                      | g) Carlos Palazón<br>h) Juan Barriuso<br>i) Antonio Delgado             |
| 22 ene | Soria<br>Soria                    | Visita Centro de Investigación Forestal de Valonsadero en Soria. Reunión con investigadores y directora del Centro Dra. Ana Hernández. Visita a trabajos proyecto LIFE y trufas naturales, cosechas de trufas                                                                     | j) Ana Hernandez                                                        |
| 23 ene | Soria<br>Villaciervos<br>Pamplona | Visita operaciones de empresa Arotz-Catesa en Villaciervos (plantación 700 hectáreas), viveros y comercialización. Reunión con Gerente operaciones D. Pedro Carbajo                                                                                                               | k) Pedro Carbajo                                                        |



|        |                      |                                                                                                                                                                                             |                                                       |
|--------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 24 ene | Pamplona<br>Pamplona | Reunión con equipo de trabajo de truficultura, Universidad de Navarra (Depto Botánica) e Instituto Técnico de Gestión Agrícola                                                              | l) A. M. de Miguel<br>M. Luisa Etayo<br>Reimundo Saez |
| 25 ene | Pamplona<br>Pamplona | Visita a plantaciones truferas en Navarra                                                                                                                                                   | A. de Miguel<br>R. Saez                               |
| 26 ene | Pamplona<br>Valencia | Regreso a Valencia                                                                                                                                                                          |                                                       |
| 27 ene | Valencia             | Día libre                                                                                                                                                                                   |                                                       |
| 28 ene | Valencia             | Visita banco de semillas y viveros forestales de Quart de Poblet.                                                                                                                           | m) Antoni Marzo                                       |
| 29 ene | Valencia             | Reuniones de trabajo en Fundación CEAM                                                                                                                                                      |                                                       |
| 30 ene | Valencia             | Reuniones Conselleria de medioambiente de la Comunidad valenciana y Universidad Politécnica de Valencia. Reunion de trabajo con investigadores y técnicos del Gobierno Regional Valenciano. | n) Juan Uriol<br>Luis Velasco<br>F. Galiana           |
| 31 ene | Valencia             | Trabajos del proyecto en CEAM: Metodologías de análisis de Micorrizas y Análisis del material de propagación a internar a Chile (Trufas)                                                    | S. Reyna<br>L. Folch                                  |
| 1 feb  | Valencia<br>Chile    | Regreso a Chile                                                                                                                                                                             |                                                       |

## PRIMERA PARTE

### 2. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

#### 2.1 SE CONOCIERON IN SITU LAS TÉCNICAS Y OPERACIONES PARA LA PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE PLANTA MICORRIZADA CON TRUFA NEGRA EN ESPAÑA.

La producción artificial de planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt., es una de las bases sobre las que se sustenta la truficultura de hoy en día. Desde que a finales de los años 60, la labor conjunta entre la Universidad de Turín (Italia) y el INRA de Clermont-Ferrand (Francia), permitió el establecimiento de un método seguro para la producción de plantas micorrizadas con dicho ascomiceto, han sido muchos los años transcurridos sin que los detalles de dicha metodología hayan visto la luz. De hecho a lo largo de los años se han producido diversas modificaciones, referentes a los contenedores, al tipo de sustrato y al método de inoculación empleado, intentando una mayor seguridad y eficacia en la micorrización.

Según Palazón (2002), el CTIFL francés tiene censadas más de treinta empresas dedicadas a esta actividad. En España no llegan a diez, siendo varias de ellas, filiales de entidades francesas.

Se pueden establecer varias hipótesis relacionadas con este hecho: En primer lugar, el mercado potencial del producto es muy superior al mercado real en Europa, que aparte del elevado valor de compra, nunca se tiene 100% seguridad de que, transcurridos 8 ó 10 años, se puedan cumplir las expectativas de producción. En segundo lugar hay que considerar la dificultad que presenta la fijación de la simbiosis *T. melanosporum-Quercus* spp. (p. ej.). Las instalaciones necesarias no se basan sólo en equipamiento como invernaderos, desinfectadora de suelos, control de temperatura, laboratorios con equipos de microscopía, estufas y cámaras de incubación, sino que deben extremar las medidas para evitar contaminaciones indeseables, que pueden arruinar toda una campaña. Por ello no es de extrañar el uso de filtros depuradores del agua de riego y condiciones de aislamiento y seguridad en los recintos de incubación de la simbiosis, que dificulte el acceso a otros hongos contaminantes.





Por otra parte, la dirección de técnicos especialistas se hace casi imprescindible para garantizar un manejo correcto de las instalaciones.

Las empresas productoras de planta micorrizada conocen muy bien estos problemas, por eso guardan celosamente su experiencia adquirida, protegida muchas veces por patentes industriales, siendo normal, por ello, que el resultado final esté marcado con un alto precio (alrededor de 67 US\$/planta), que no hace más que reflejar el riesgo y la dificultad del producto ofertado.

#### 2.1.1. VISITA AL SERVICIO DE INVESTIGACION AGROALIMENTARIA (SIA) DE LA D.G.A., UNIDAD DE SANIDAD VEGETAL, ZARAGOZA (ESPAÑA).

En este centro se intenta desde el año 1993 la apertura al sector, de una metodología eficaz de micorrización de especies vegetales, fundamentalmente *Quercus* spp., con *T. melanosporum*, con una reducción de costos que hagan mucho más accesible el producto. Dichos trabajos se han desarrollado paralelamente a los del establecimiento de una normativa de certificación, que permita asegurar la calidad de los simbiontes.



Foto 1. Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA) de la D.G.A., en Zaragoza (España)

#### EXPERIMENTACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTA MICORRIZADA (Servicio de Investigación Agroalimentaria)

La producción de planta micorrizada con trufa negra se realiza completamente al interior de invernadero perteneciente al centro, el cual posee equipamiento para control de temperatura y riego.

Los trabajos relativos a inoculación y producción de planta trufera los dirige el Dr. Carlos Palazón quién ha estado tabajando en ensayos para determinar la influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. con *T. melanosporum* Vitt., mediante el desarrollo de una técnica sencilla, económica y eficaz, que disminuya igualmente las tasas de mortalidad inherentes a la misma.

En este centro se trabaja con un único material vegetal, *Quercus ilex* L., obtenido a partir de la siembra de semilla previamente desinfectada, en contenedores plásticos de base ventilada, sobre un sustrato de vermiculita, previamente humedecida.

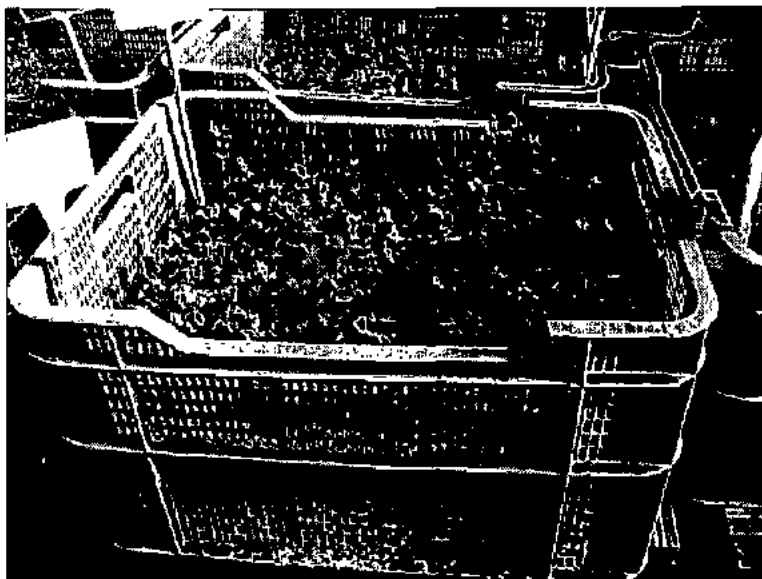


Foto 2. Sistema de siembra y germinación en vermiculita

Los componentes de sustratos de inoculación que se han estado ensayando, están incluidos en la tabla nº 1. Las diferentes mezclas ensayadas varían fundamentalmente por el contenido en tierra de textura arcillo-limosa, calcárea, con un pH de natural de 8,23. La mezcla de todos los componentes se realiza en hormigonera, excepción del KOH, esterilizando el sustrato resultante en una desinfectadora de suelos, a 96°C, durante 180 minutos. Pasadas 2 semanas se añade (al mismo) un abono de liberación lenta (10-1-8) a razón de 3 kg/m<sup>3</sup> de sustrato.

**Tabla 1.** Componentes de las mezclas de sustratos ensayados en el centro

| TIERRA<br>(Arcillo-<br>limosa) | H.SUBSTRAT ®<br>(Turba) | VERMICULITA<br>Nº 3 | DOLOMITA | KOH |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|----------|-----|
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|----------|-----|

**Material fúngico para inocular:** Los carpóforos (*Tuber melanosporum*) se lavan con agua y un cepillo, eliminando las partículas de tierra adheridas a su superficie. Una vez secos, se procede a su desinfección, sumergiéndolos en etanol de 96° y flameando a continuación durante 10 ó 15 segundos. Posteriormente se cortan los carpóforos en láminas lo más finas posibles momento en que se aprovecha para confirmar la especie, observando las ascosporas en el microscopio, depositándolas en bandejas de plástico que se cubren con paños de muselina para evitar contaminaciones externas.

El conjunto se deja secar en estufa a 45°C durante un periodo de 4-7 días, tiempo necesario para eliminar la humedad y poder triturar las láminas en molino, hasta la obtención de un polvo lo más fino posible, que permita preparar la mezcla con los diferentes coadyuvantes de la inoculación, facilitando la dosificación y el reparto del inóculo.

En los trabajos del centro se ha experimentado con 3 productos coadyuvantes para favorecer la inoculación:



Cola de conejo (Colágeno): Este producto se extrae de los residuos de materia orgánica procedentes de tripas, restos de gelatinas y pieles de diversos animales). Su composición es 100% proteína animal. Es un compuesto sólido, existente en el mercado, que se utiliza como adhesivo. Para su preparación hay que disolverlo previamente en agua, al baño-maría.

Alginato de sodio: Es una sustancia coloidal natural, sal del ácido algínico, muy próxima a los ácidos húmicos del suelo. Se elabora a partir del alga parda marina, es soluble en agua formando con ella un compuesto gelatinoso, que retiene la humedad.

Talco: hidrosilicato de magnesio y de hierro. Tiene usos diversos aunque su uso como coadyuvante se basa en la gran adherencia de sus partículas, que le permiten retener el agua y fijarse a las raíces de las plantas.

#### Métodos de inoculación utilizados:

- Inoculación por espolvoreo:

Se aplica sobre raíz desnuda en las plantas producidas sobre vermiculita, utilizando el talco finamente mezclado con la trufa en polvo, que se dispersa sobre las raíces con la ayuda de un salero de luz muy fina, especialmente preparado para ello.

Este método permite ajustar la dosis al valor deseado de un modo exacto, utilizándose generalmente dosis de inóculo desde 0,5 hasta 2 g/planta, que se reparten con 0,5 g de talco por cada planta, previamente a la inoculación.

- Inoculación mixta: Inmersión + espolvoreo:

Las plantas, producidas igualmente en vermiculita, se sumergen a raíz desnuda en alguno de los geles anteriormente descritos - alginato de sodio o cola de conejo – sin trufa incorporada. Una vez retiradas las plantas, se procede a espolvorear sus raíces impregnadas por el coadyuvante, con trufa en polvo pura, en la cantidad o dosis requerida.

Todas las inoculaciones, se realizan a raíz desnuda, previamente al trasplante en contenedor Polix ® de 350 ml de capacidad (Fig. 3 y 4). Dichos contenedores son bandejas forestales de poliestireno expandido de alta densidad, con los alveolos en forma de tronco de prisma, de medidas 5 x 5 x 14 cm<sup>3</sup>. Cada alveolo dispone de una funda plástica de PVC, estriada, que encaja en dichas medidas y que impide el enrollamiento y la espiralización de las raíces.

Las inoculaciones con *Tuber melanosporum* se realizan cuando las plantas tienen 3,7 meses.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

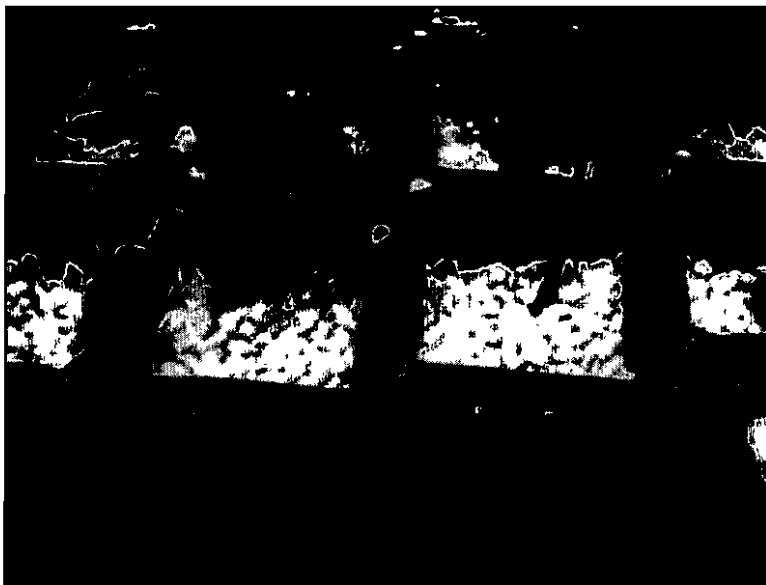


Foto 3. Contenedor Polix ® de 350 ml de capacidad

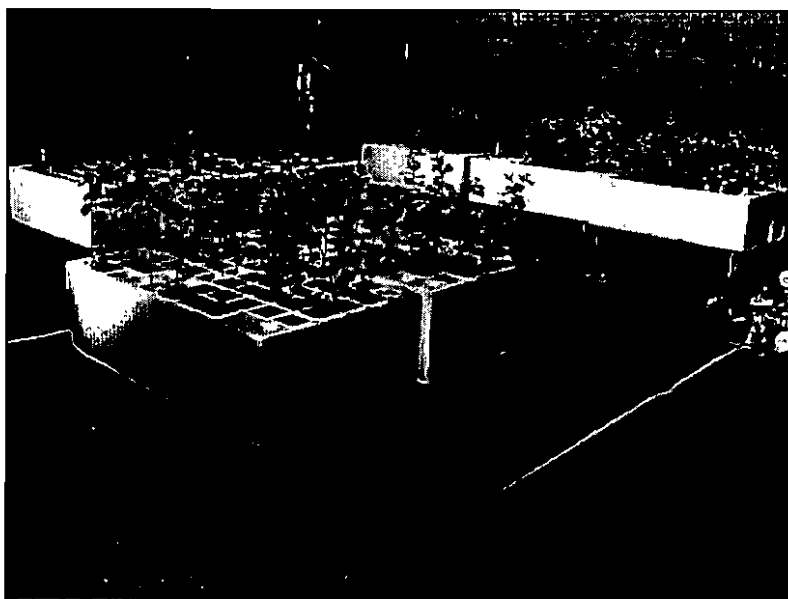


Foto 4. Detalle del montaje de los contenedores dentro de invernadero



Foto 5. Detalle de la apertura de contenedor para su análisis

Los resultados de los diferentes ensayos indican que el tipo de coadyuvante utilizado produce algo de mortalidad en las plantas, pero sólo cuando va mezclado con el inóculo fúngico. Este hecho parece indicar la existencia de una interacción entre *T. melanosporum* y los coadyuvantes, aunque no se puede excluir tampoco el efecto patológico del hongo en los primeros estados de la simbiosis.

En definitiva, los mejores resultados de inoculación se han obtenido usando el método en seco mediante espolvoreo de raíces con el inóculo de trufa mezclado con talco (0,5 hasta 2 gramos de trufa molida/planta, que se reparten con 0,5 g de talco como coadyuvante).

En cuanto a sustratos utilizados, los basados en tierra de monte, con pH cercano a 8, parecen ser los óptimos para el desarrollo de *T. melanosporum*, sin duda por su estructura y composición nutricional, coincidiendo con la idea de algunos autores sobre la importancia de las condiciones del pH, la humedad y la fertilidad del sustrato, procurando que posea un buen aporte de materia orgánica de origen animal y vegetal. Aquí se puede encontrar la explicación del peor desarrollo de la micorrización en los sustratos basados en turba, las cuales carecen de materia orgánica que no sea vegetal. Además, las turbas carecen de oligoelementos esenciales como el cobre, cuya importancia ha sido destacada por otros investigadores.



Otro aspecto importante para la micorrización es la procedencia de la trufa, ya que los resultados de los ensayos indican que existen diferencias en la micorrización de las plantas, según la procedencia de la trufa que conforma el inóculo. Los mayores porcentajes de micorrización obtenidos con algunas procedencias, pueden estar ligados tanto a una mayor calidad de la trufa como a su composición genética. En cualquier caso, en el momento de la preparación del inóculo, se comprueba tanto la apariencia, como la coloración y el aroma de los ascocarpos de la trufa.

Estas características, son indicadoras del estado de madurez de las trufas y se han establecido algunas hipótesis de que el grado de maduración va ligado a la eficacia en la micorrización e instalación de la simbiosis.

Por otra parte, también existen diferencias en el grado de micorrización en los distintos sectores de los sistemas radicales de las plantas. Esto se detecta, al realizar los análisis de micorizas en la raíz, dividiendo esta en tres sectores (superior, medio e inferior).

Los análisis llevados en el centro han permitido detectar diferencias en el grado de micorrización de las plantas entre los tres sectores de la raíz, donde se procede al recuento de ápices micorizados, observándose generalmente un mayor porcentaje en el primer sector (tercio superior de la raíz), que difiere significativamente del resto. En este sentido hay que decir que el lugar de la raíz donde se localiza la mayor parte de la micorrización, puede estar relacionado con el desarrollo radicular de las plantas, con una cierta variabilidad dentro de la especie *Quercus. ilex* L.

Es lógico pensar que si la micorrización va unida a la existencia de ápices radicales, se localice esta donde haya una mayor concentración de éstos. Un factor decisivo y muy ligado a la localización de las micorizas, lo constituye las características y el régimen del riego utilizado en el curso de la simbiosis. Aportes hídricos irregulares conducen generalmente a una mayor abundancia de micorizas cuando la humedad mantiene parámetros normales.

Es vital conocer previamente las condiciones del invernadero, para garantizar que la insolación, evaporación y distribución del riego o los microaspersores, no impidan una aplicación homogénea del agua, evitando los excesos que pueden provocar problemas de contaminación con otros hongos, competidores potenciales para la trufa.

#### METODOLOGIA DESARROLLADA PARA EL CONTROL DE CALIDAD Y CERTIFICACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN (Servicio de Investigación Agroalimentaria).

##### A) Control de las esporas de trufa

Se recogen tubos de ensayo, muestras de las suspensiones de esporas que se han utilizado para inocular los lotes. Cada tubo se identifica anotando la especie vegetal, número de lote y fecha de inoculación.

Terminada la inoculación de cada lote, las muestras se observan al microscopio analizando las ascosporas del inóculo esporal y la presencia de posibles contaminantes.

##### B) Identificación del lote homogéneo

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

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



#### C) Toma de muestras

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

Es algo evidente que el tamaño de la muestra representa el aspecto más importante sobre el que se va a basar cualquier análisis estadístico. En este caso el tamaño está condicionado por el alto precio de las plantas y por la laboriosidad del análisis que se realiza sobre las mismas y que siempre es destructivo.

Estos hechos han influenciado la elección de un porcentaje de muestreo, o tamaño de muestra, que se ha cifrado en un 5 p.1000 como mínimo, aunque se recomienda que, en los primeros años de certificación se empiece con un 8 p.1000.

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

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

#### D) Lavado de las plantas

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

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

#### E) Primera observación a la lupa

Una vez lavada la planta, se sumerge horizontalmente en un recipiente con agua. El recipiente puede ser transparente o de algún color en la base, que contraste con la coloración de la raíz, si ello facilita la observación (Foto 6).

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

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

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

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

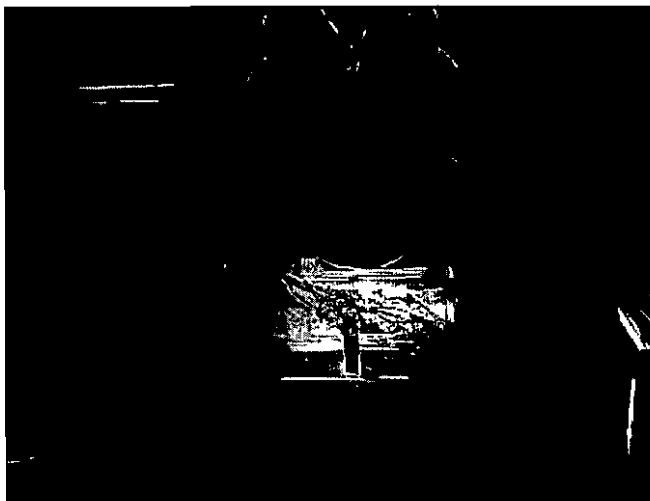


Foto 6. La planta se introduce en un contenedor con agua, para su observación

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

#### F) Conteo de las micorrizas

Inmediatamente después de realizar la primera observación procedemos a sacar la planta de su recipiente, colocándola sobre la mesa, próxima a una regla o plantilla que nos permita dividir el aparato radicular de la planta en tres sectores (S1=superior, S2=medio y S3=apical), aproximadamente de la misma longitud (Foto 7).

De cada una de las 3 divisiones extraemos totalmente al azar un número suficiente de raíces que nos permitan contar un mínimo de 100 ápices radicales (Foto 8).



Foto 7. La raíz se corta en 3 partes iguales, depositando su contenido en placas Petri



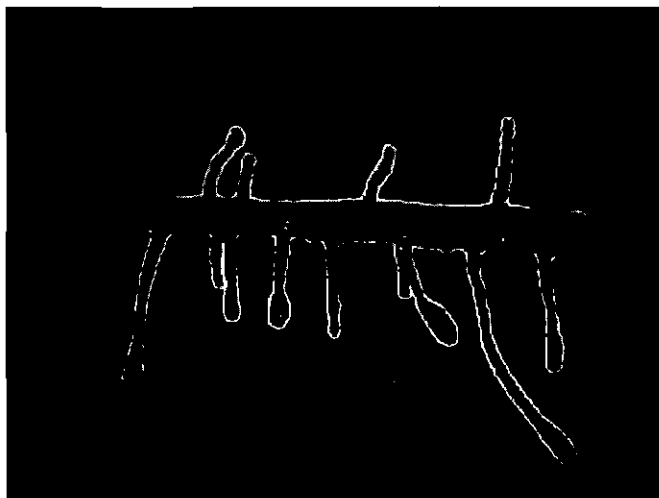


Foto 8. Aspecto que presentan las raíces durante su conteo. Pueden observarse ápices micorrizados juntos a otros que no lo están.

Al final se obtienen, pues, 3 porcentajes, de los que se calcula la media aritmética, que corresponde al porcentaje de micorización (PM) de la planta analizada. Todos los datos obtenidos desde la recepción del lote son registrados en una hoja de evaluación que facilite el control de los mismos.

#### G) Requisitos mínimos exigibles

Este es uno de los aspectos de mayor responsabilidad y que ha suscitado mayores discusiones en su elaboración, pues se trata de fijar unas condiciones mínimas, a sabiendas de que en algunos casos pueden resultar insuficientes y en otros excesivas.

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

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

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



## 2.1.2. VISITA A VIVEROS VIVERTRUF (Viver, Castellón, Valencia).



Foto 9. Invernaderos de Vivertruf, Castellón, Valencia.

Vivertruf, es una empresa dedicada a la producción de planta micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) desde hace 7 años. Esta empresa solo produce plantas inoculadas de *Quercus ilex*, basándose en un sistema de producción sencillo, sin embargo la técnica de inoculación que han desarrollado es guardada bajo secreto comercial.

El control de calidad y certificación de la micorrización es llevada a cabo por el CEAM en Valencia, mediante el uso de una metodología de análisis desarrollada en este centro por Santiago Reyna y su equipo de trabajo.

La producción de planta inoculada con trufa en esta empresa ha resultado ser de alta calidad, lo cual ha sido comprobado por análisis efectuados en CEAM (valencia).

### DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO PRODUCTIVO

El cultivo completo de las plantas pre y post inoculación es llevado a cabo en invernaderos tipo túnel (Foto 9). Los invernaderos en general son de características sencillas en su construcción y no presentan equipamiento para el control de las condiciones ambientales. Sin embargo el proceso productivo es llevado bajo un estricto control de higiene y seguridad para evitar contaminaciones. Para esto se utiliza malla antiáfidos en la ventilación de los invernaderos, además el piso es cubierto con una malla especial antimalezas, lo cual evita contaminaciones a través del suelo.

Todos los sustratos utilizados en la producción son previamente esterilizados mediante el uso de generador de vapor.

Las semillas se lavan en agua corriente desechando las que flotan y se desinfectan con una solución de hipoclorito sódico. Las semillas proceden, preferiblemente, de una zona trufera, no es imprescindible que sean de una planta trufera productora.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

Las semillas se siembran directamente sobre sustrato de perlita o vermiculita y se mantienen en invernadero hasta que alcanza la parte aérea alrededor de 4 a 5 cm. A partir de este tamaño el cultivo se realiza en bandejas de contenedores posterior a la inoculación.



Foto 10. Sistema de siembra en vermiculita

El sistema de inoculación empleado, en general se basa en la inmersión de raíces en inóculo líquido (suspensión de esporas+coadyuvante). La suspensión de esporas se prepara mediante un triturado de trufa previamente limpia y desinfectada. La trufa molida se mezcla con agua destilada para formar la suspensión y a esta se le adhiere un coadyuvante. En las inoculaciones se utiliza trufa bien madura, incluso casi podrida, la cual es cosechada posterior al 15 de enero y se confirma que corresponde a *TUBER MELANOSPORUM*.



Foto 11. Trufas seleccionadas para la formulación del inóculo



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

La formulación exacta del inóculo y su aplicación, permanece bajo secreto comercial por parte de la empresa.

Los contenedores de transplante que se utilizan después de inocular son de 650 cc., plásticos, con sistema de autopoda y estriados para evitar el espiralamiento de raíz (Quickpot®, Foto 10)

Ya inoculadas las plantas se colocan en los contenedores y se rellena con el sustrato previamente esterilizado. El sustrato es una mezcla de varios componentes, pero se basa en tierra de monte calcárea con un pH cercano a 8 que es mezclada con turba, vermiculita y carbonato de calcio, además se le agrega un fertilizante de liberación lenta.

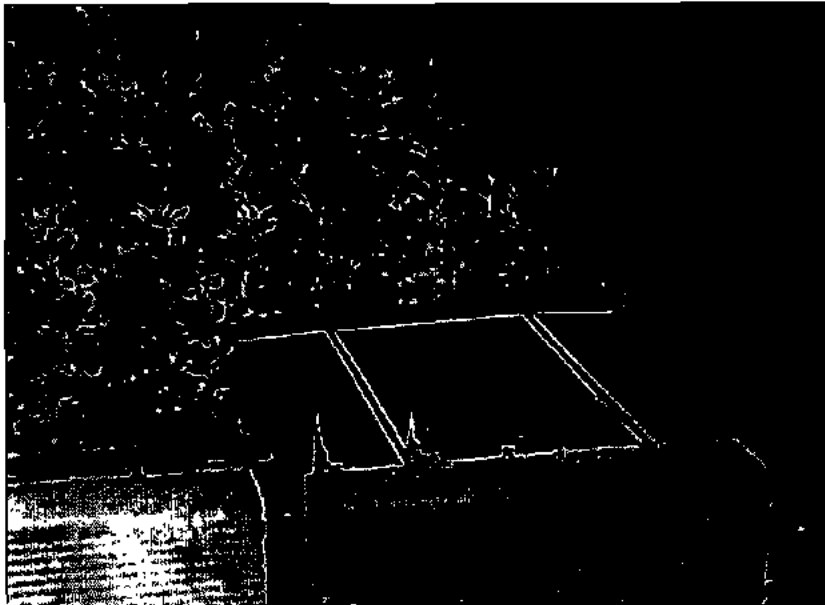


Foto 10. Bandejas Quickpot® usadas para el cultivo de planta inoculada con trufa

#### Controles del proceso

**Substratos:** los substratos se someten a un proceso de esterilización para evitar la presencia de propágulos de otros hongos de micoriza que puedan competir con *T. melanosporum*. Para esto se utiliza la esterilización con vapor de agua a 120 °C mediante generador de vapor, suficientes 3 horas cuando la masa de tierra alcanza los 90°C.

**Semillas:** las semillas se lavan con agua corriente clorada y se desinfectan antes de estratificarlas sobre sustrato mineral estéril con un desinfectante superficial (hipoclorito de sodio). El origen de la semilla (regiones de procedencia) es elegido de acuerdo a su cercanía con la zona trufera a la cual se destinarán las plantas.

**Contenedores:** en general se utilizan contenedores nuevos para evitar problemas de contaminaciones, sin embargo se han reutilizado también algunas partidas de bandejas, las cuales han sido desinfectadas antes de usar, con buenos resultados posteriores. Las bandejas contenedores se instalan levantadas más de 20 cm. sobre el suelo para contribuir al aislamiento.

**Riego:** para el riego se utiliza agua de pozo, que es clorada y posteriormente se reposa en estanque por 48 horas para que pierda el cloro residual, antes de ingresar a invernadero.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

Otros: para cubrir el suelo se utiliza una malla plástica especial antimaleza, que sirve además para aislar el suelo y evitar el acceso de hongos competidores a los sustratos de cultivo (Ver Foto 9).

Todas estas medidas tienen como objetivo mantener medidas de higiene y seguridad dentro del ambiente de cultivo, para así evitar al máximo contaminaciones con otros hongos.

### 2.1.3. TRABAJOS PRÁCTICOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE MICORRIZAS EN LABORATORIOS DEL CEAM EN VALENCIA

El Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (Reyna, 1997, 1999), ha desarrollado una metodología para el control de calidad y certificación de planta micorizada con trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) .

La metodología esta basada en el control del grado de micorrización a través de muestreos volumétricos del sustrato de cultivo.

Para conocer la aplicación del método, se procedió a tomar muestras procedentes del vivero de la empresa Vivertruf para su posterior análisis en laboratorio.

#### Metodología empleada

Del cepellón de cada planta, cultivada en contenedor, se extrae con un sacabocados una muestra cilíndrica de 1,4 cm de diámetro en la zona media del contenedor y una longitud equivalente a la anchura del contenedor a esa altura, que varía con el tipo de contenedor. Esto supone un volumen muestreado del orden de 7 a 9 cc., equivalente, aproximadamente, a un 2% del volumen del contenedor. La muestra cilíndrica se extrae en sentido horizontal. Se introduce el sacabocados imprimiendo una rotación constante para realizar el corte de las raíces y evitar su rotura.

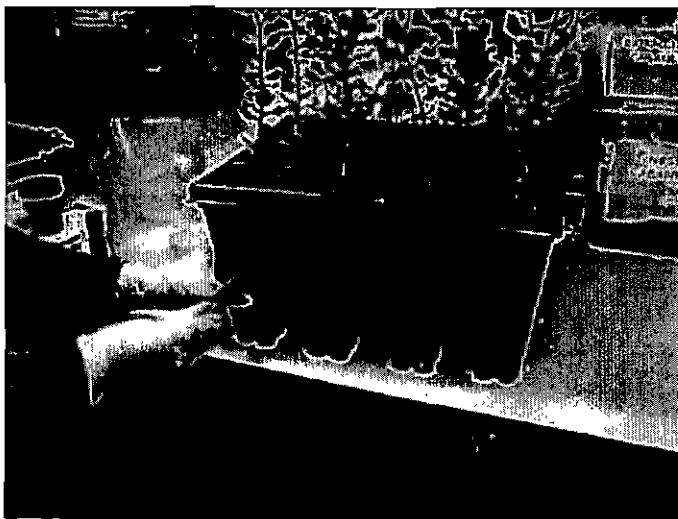


Foto 11. Toma de muestra



Foto 11. Extracción de la muestra

Se procedió luego a introducir la porción del cepellón en un envase de plástico y se pesa en el laboratorio con precisión de 0,1 gramos. Se incorporan unos 100 cc. de agua a cada muestra junto a un detergente comercial (Calgón).

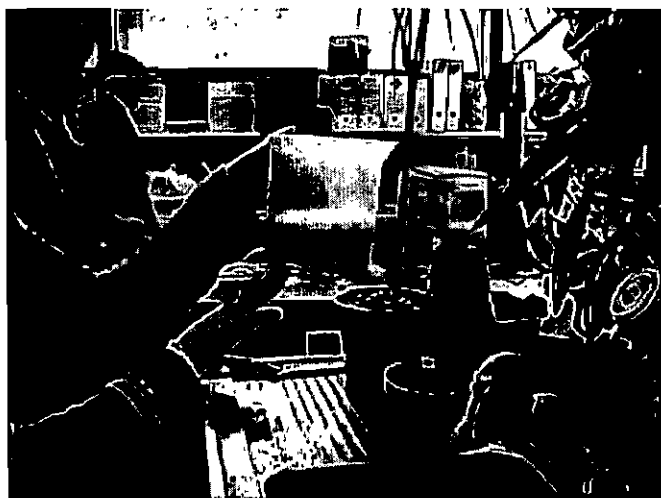


Foto 12. Mezcla de la muestra con agua y detergente

Las muestras se someten a un baño de ultrasonidos de 15 minutos. A las 24 horas se da un nuevo baño de ultrasonidos y se pasa el contenido del envase a un vaso de precipitados de 0,5 l. incorporando agua hasta completar los 500 cc.

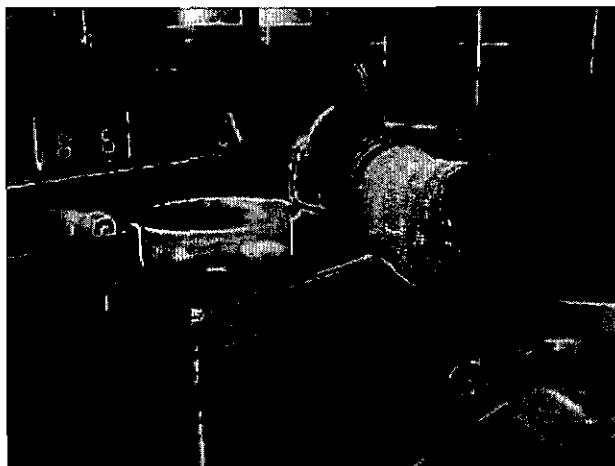


Foto 13. muestra sometida a un baño de ultrasonidos

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

El material se recoge sobre un tamiz de 1 mm y se vuelve a lavar por inmersión lenta en un vaso de precipitado. El producto decantado en el fondo del vaso se observa nuevamente con el fin de comprobar que no se han perdido ápices micorizados.

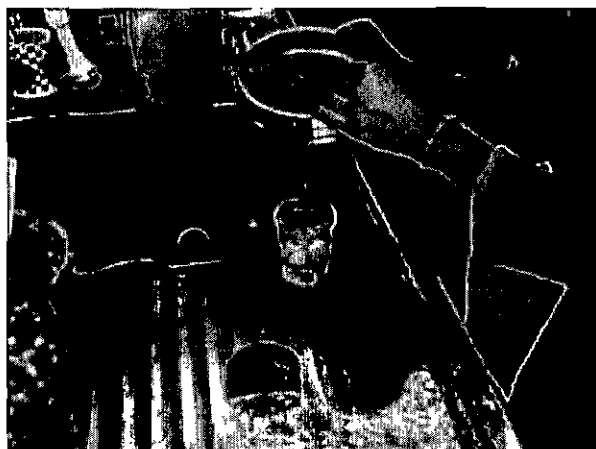


Foto 14. Muestras de raíces y micorrizas sobre un tamiz



#### Control cualitativo de micorizas:

Mediante el uso de lupa binocular se realizó un control de la existencia efectiva de micorizas de *Tuber melanosporum*. Cuando se presentan dudas sobre el reconocimiento de alguna micoriza se observa al microscopio el manto y la ornamentación de espinulas, comprobándose que se trata de micorizas de *T. melanosporum* con la ayuda de claves morfológicas.



Foto 15. Observaciones de micorizas al microscopio (laboratorios CEAM)

#### Control cuantitativo de micorizas:

Las metodologías de control del grado de micorización que se utilizan frecuentemente se basan en parámetros porcentuales, es decir de una planta o un lote de plantas se comprueba que tienen un determinado porcentaje de ápices radiculares micorizados con la especie de interés. Evidentemente el dato es pobre puesto que se desconoce cuantos ápices tiene la planta y, consecuentemente, la cantidad de inóculo que se está adquiriendo.

La metodología desarrollada por el CEAM obtiene datos relativos al número de micorizas por planta, el % de micorización y el % de contaminaciones con otras micorizas. Está basado en la extracción de muestras cilíndricas de sustrato y raíces, lo cual se expresa en relación al volumen de muestra y por tanto se extrapola al volumen del cepellón.

El método de muestreo utilizado es el descrito anteriormente. Para el análisis cuantitativo, la muestra obtenida mediante el proceso indicado anteriormente, se coloca en lupa binocular y se procede al conteo de ápices micorizados, ápices sin micorizar y micorizas contaminantes.

Cuando se presentan dudas sobre el reconocimiento de alguna micoriza se comprueba al microscopio el manto en *puzzle* y la ornamentación de espinulas en ángulo recto (Fotografías 16 y 17), comprobándose que se trata de micorizas de *T. melanosporum*.





Foto 16. Detalle del manto en puzzle de una micorriza de *Tuber melanosporum*



Foto 17. Detalle de espinulas en ángulo recto de *T. Melanosporum*

Para la cuantificación, se contabiliza el número de micorrizas de *T. melanosporum*, ápices no micorrizados y contaminaciones con otras micorrizas. Todas las referencias se calculan en volumen, la alternativa de referirlo al peso de la muestra da mayores diferencias debido a la diferente humedad, porosidad o un sustrato poco uniforme.

El sistema utilizado (muestreo volumétrico) permite obtener valores promedio del número de micorrizas por planta, que en definitiva es el “producto activo” de una planta micorrizada, o inóculo que adquirimos, por lo tanto consideramos que este sistema es más efectivo que el basado en parámetros porcentuales, además su aplicación consume menos tiempo.



El método de control establece la siguiente escala de calidad de planta micorrizada:

| Calidad      | Nº de micorizas de <i>T.melanosporum.</i> / planta |
|--------------|----------------------------------------------------|
| Insuficiente | 1 - 100                                            |
| Escasa       | 101 - 250                                          |
| Aceptable    | 251 - 500                                          |
| Buena        | 501 - 1500                                         |
| Muy buena    | 1500 - 3000                                        |
| Excelente    | Más de 3000                                        |

Este método también evalúa la presencia de hongos de micorrización de infección del sustrato, considerando que el grado admisible de micorrización con otros hongos, supone que no debe superar el 25% sobre el número de ápices micorizados con *Tuber melanosporum*, Vitt.

Ese sistema tiene un gran interés ya que da resultados en función del volumen y no como porcentaje y permite comparar sistemas radicales entre sí. Por ejemplo: ¿que planta presenta un mejor grado de micorrización, una con 500 raicillas y un grado de micorrización del 40% u otra con 4000 raicillas y un grado de micorrización del 20%?



#### 2.1.4. VISITA A VIVEROS EMPRESA AROTZ-CATESA EN SORIA



Foto 18. Invernaderos para producción de planta trufera (Arotz-Catesa, Soria)

La empresa Arotz-Catesa, ubicada en Navaleno, Soria, posee las mayores plantaciones de árboles truferos en el mundo. Hoy en día poseen superficies de alrededor de 700 ha. con *Quercus ilex*, la mayoría en plena producción.

Esta empresa está dedicada casi en exclusiva al negocio de la trufa, abarcando sus tres fases: Producción de planta micorizada, cultivo en campo y comercialización.

Para la producción de planta inoculada con trufa poseen invernaderos con ambiente controlado, y desarrollan un proceso de inoculación que es utilizado en Francia por otras empresas. Parte de su tecnología se mantiene como secreto comercial, por lo cual podremos describir sólo su proceso general.

El sistema de producción de plantas comienza con la siembra y germinación de las semillas en vermiculita, similar a los métodos empleados en los otros viveros visitados en la gira (Foto 19).

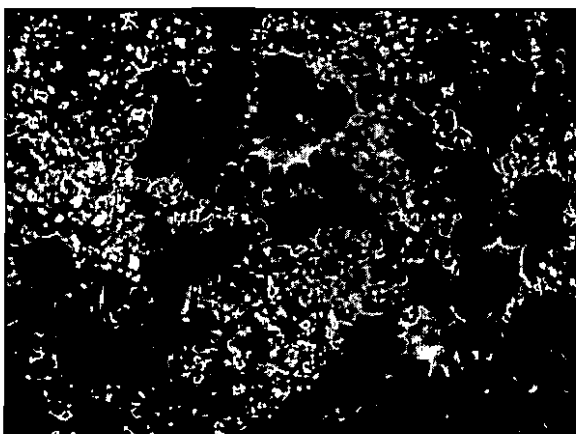


Foto 19. Plantas de *Quercus ilex* en sustrato de vermiculita



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

El sistema de inoculación se basa en un proceso desarrollado en Francia, donde la planta se cultiva en una envoltura no tejida penetrable por las raíces y rellena de un sustrato fertilizado con un fertilizante de liberación controlada. Este sistema se denomina *MELFERT*® y permite constituir, por simple enrollamiento de la envoltura alrededor de la planta un cepellón de cultivo completo.

El sistema *MELFERT*® consiste en un pañal de material celulósico con el que se rodea la planta y al que se incorpora la solución esporífera con *Tuber melanosporum*, Vitt.



Foto 20. Plantas inoculadas en cepellón *MELFERT*® (Arotz-Catesa, Soria)

Este sistema presenta algunos inconvenientes ya que todo el cultivo se desarrolla en el pañal por lo que el sistema radical no adquiere una buena conformación. Sin embargo de acuerdo a informes de los profesionales encargados, los niveles de micorrización alcanzados con este sistema son altos.

El posterior trasplante a campo de la planta *MELFERT* presenta dificultades debido a la lentitud en la descomposición del material celulósico que dificulta el desarrollo de las raíces y la colonización del suelo.



Foto 21. Detalle del cultivo dentro de invernadero



INFORME ANEXO 1.6.

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE GIRA TÉCNICA A ESPAÑA

TERCERA PARTE

2.3. SE CONOCIERON CONDICIONES ECOLÓGICAS, ASPECTOS DE PRODUCCIÓN Y MANEJO EN MONTES NATURALES PRODUCTORES DE TRUFA.

Las producciones de trufa en España, tradicionalmente han provenido de montes naturales de *Quercus ilex*, que producen trufa en forma natural. A diferencia de Francia donde la producción de trufa negra proviene principalmente de plantaciones. Sin embargo, actualmente en España las plantaciones artificiales se han ido expandiendo alrededor de todas las zonas truferas y actualmente representan parte importante de la producción total.

Dentro de las visitas realizadas en la gira, se conocieron las principales zonas de producción en España (Castellón, Zaragoza, Soria y Navarra), tanto de producción natural como plantaciones artificiales.

Las condiciones ecológicas en las que se desarrolla la trufa en la mayor parte de las regiones españolas y particularmente en el sistema ibérico corresponden al piso supramediterráneo, que unido a la calidad deficiente de los suelos implica que la potencialidad agrícola de estas zonas sea extremadamente limitada.

Las plantaciones artificiales en general se establecen cerca de áreas que producen trufa silvestre, donde los suelos y el clima se mantienen dentro de los parámetros requeridos por *Tuber melanosporum*.



Foto 1. Zona trufera característica en Soria (Castilla-León)



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85



Foto 2. Detalle de la colecta de trufa con ayuda de un perro para su detección (Soria)

#### CARACTERIZACIÓN ECOLÓGICA DE ZONAS PRODUCTORAS DE TRUFA NEGRA EN ESPAÑA

El clima general de las mejores zonas trufas en España corresponde a un Mediterráneo continental con termoclima supramediterráneo inferior y ombroclima seco con tendencia al subhúmedo.

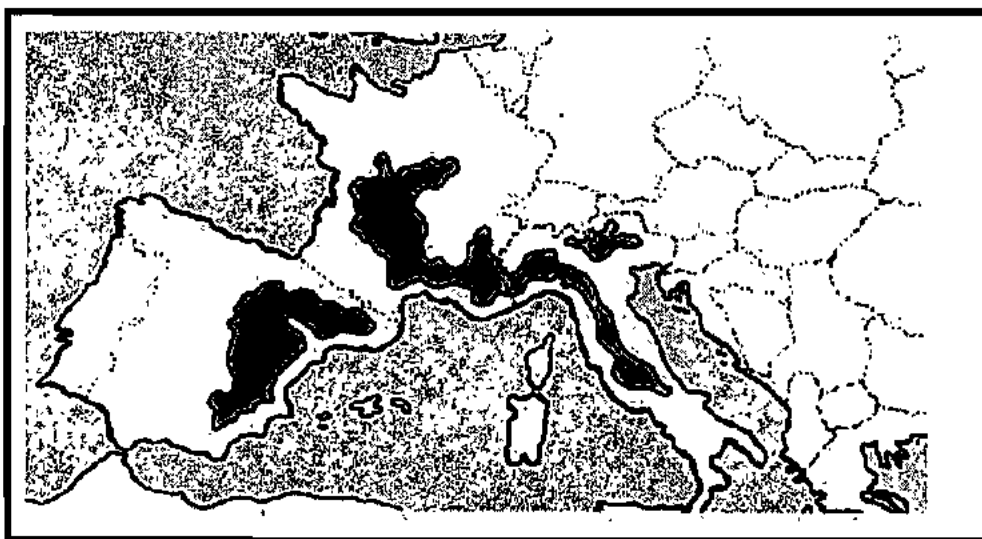


Fig. 1. Mapa que muestra la distribución de la trufa negra en Europa (Ver España)  
FUENTE: Reyna, 2002



#### Pluviometría:

- Necesidades pluviométricas entre los 500-900 mm. anuales.
- Las primaveras no deben ser secas.
- Los inviernos sin lluvias excesivas.
- *Las lluvias en verano son básicas para lograr una buena producción.*
- Sequía estival no muy intensa, entre julio y agosto (España) lluvias por encima de los 100 mm.

#### Temperaturas de zonas productoras

|                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| Temperatura media anual               | 11-14° C.      |
| Temperatura máxima del mes más cálido | 23-32° C.      |
| Temperatura media del mes más cálido  | <22° C.        |
| Temperatura mínima del mes más frío   | (-2)-(-6)° C.  |
| Temperatura media del mes más frío    | >2° C.         |
| Temperatura máxima absoluta           | 35-42° C.      |
| Temperatura mínima absoluta           | (-9)-(-25)° C. |

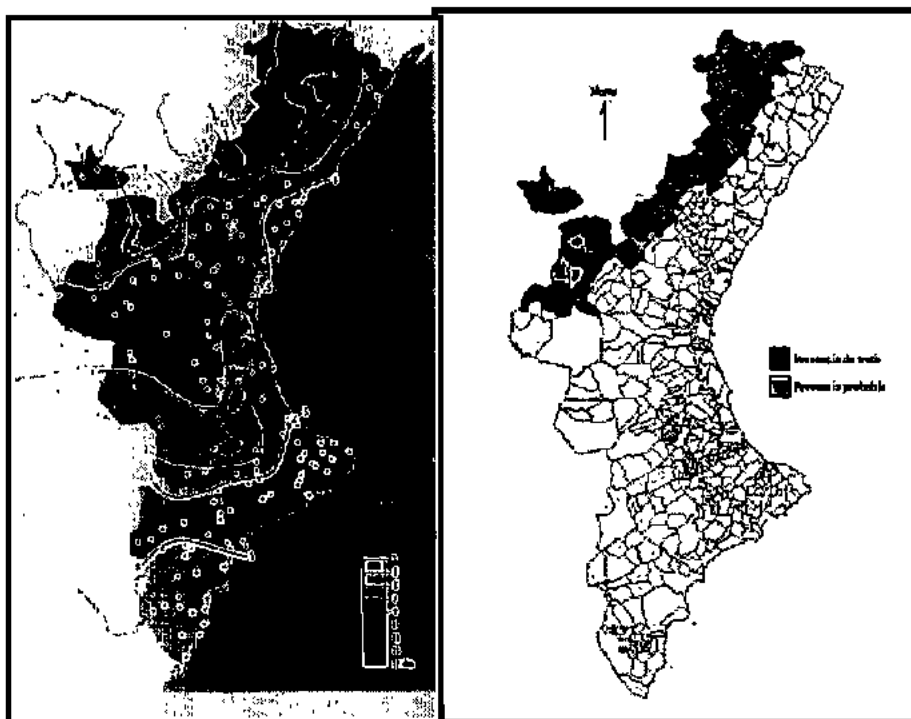
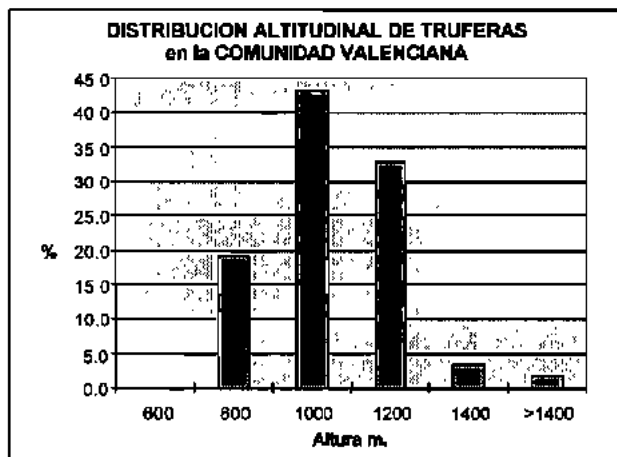


Fig. 1. Los mapas muestran una comparación entre el N° de lluvias de verano anuales y producción de trufa en la comunidad Valenciana (Ver el grado de ajuste)  
FUENTE: Reyna, 2002



En cuanto a altitud, la trufa se distribuye en España casi siempre por encima de los 600 m. de altitud. Siendo normal que en las zonas más al sur de su distribución, las mejores trufas se sitúen entorno a los 1.000 m. de altitud (Ejemplo: ver gráfico obtenido de REYNA para trufas en Valencia).



La pendiente óptima para una trufera es la inferior al 10% y la orientación debe favorecer la insolación del suelo.

Situación en España (Reyna):

Pendientes >30% : 33%

Pendientes medias 5-30% : 62%

Pendientes escasa <5% : 5%

*Zonas con buen drenaje sin riesgo de encharcamiento*



Foto 3 Ejemplo de una trufera natural productora en Soria (Ver pendiente característica)





En lo que respecta a la exposición de la pendiente las mejores truferas suelen tener orientación a solana (en general en España, exposición sur), sin embargo, cuando la estación es muy seca y calurosa esta orientación puede girar hacia umbrías en busca de un mejor balance hídrico. (Para Chile la situación óptima sería con exposiciones Norte).

#### Suelos:

La trufa, en forma natural se desarrolla sobre suelos calcáreos de 10-40 cm de profundidad del tipo rendzina, calcosoles y calcisoles. Para cultivar trufa en suelos ácidos es necesario aportar enmiendas calizas para aumentar el pH.

Los suelos donde se distribuye la trufa en forma natural en España, presentan en general las siguientes características:

La textura de los suelos, junto con la caliza y la materia orgánica, es uno de los parámetros principales que determinan la naturaleza de la estructura y, por lo tanto, los caracteres de aireación e hidrodinamismo del suelo. La textura para suelos truferos corresponde a una equilibrada.

Son inadecuados para el desarrollo de la trufa los suelos muy arcillosos por su compactación excesiva; los suelos limosos, limo-arcillosos o limo-arenosos, por su carácter muy desfavorable al apelmazamiento; y los suelos excesivamente arenosos, por su poca capacidad de retención de agua.

La mejor estructura de suelo es la que asegura el máximo de aireación y, al mismo tiempo, la mayor facilidad para la penetración de las raíces del árbol y el micelio de la trufa. Esta descripción corresponde a la llamada estructura granulosa o grumosa, resultante de un equilibrio entre arena, limo y arcilla.



Foto 4. Detalle de un suelo trufero característico en Soria (Castilla-León)



En cuanto a pH, Reyna hace un análisis de 9 truferas en la Comunidad Valenciana, concordando los valores con las mejores zonas productoras en Francia e Italia.

**Valores pH en suelos truferos valencianos**

| Tº Municipal        | pH agua 1/2.5 | pH CLK 1/5 |
|---------------------|---------------|------------|
| ADEMUZ              | 7.96          | 7.35       |
| FORCALL             | 8.23          | 7.42       |
| EL TORO 1           | 7.66          | 7.23       |
| EL TORO 2           | 7.70          | 7.29       |
| EL TORO 3           | 8.02          | 7.55       |
| EL TORO 4           | 8.04          | 7.54       |
| VISTABELLA 1        | 7.45          | 6.92       |
| VISTABELLA 2        | 7.90          | 7.37       |
| EL TORO 5           | 7.98          | 7.57       |
| Media               | 7.88          | 7.36       |
| Error típico        | 0.08          | 0.07       |
| Mediana             | 7.96          | 7.37       |
| Desviación estándar | 0.24          | 0.20       |
| Varianza muestra    | 0.06          | 0.04       |
| Mínimo              | 7.45          | 6.92       |
| Máximo              | 8.23          | 7.57       |
| Nivel confianza 95% | 0.15          | 0.13       |
| % Intervalo / media | 1.97          | 1.81       |

El pH del suelo es el parámetro principal que define la aptitud de un sitio para el desarrollo de la trufa. En España los suelos truferos presentan rangos de pH que varían entre 7.5 y 8.5 con un promedio de 7.9 para las mejores zonas, lo cual concuerda con los suelos encontrados en Francia e Italia. En España (Al igual en Francia e Italia) las plantaciones artificiales con árboles inoculados con trufa se establecen cerca de las áreas que producen trufa silvestre, de tal manera ajustarse al máximo a las condiciones agrológicas exigidas por la trufa y especies huésped.

Por otro lado, gran parte del territorio español presenta suelos calcáreos, por lo tanto el área posible de implantar con este cultivo es amplia, eso si ajustándose a los requerimientos climáticos.



Foto 5. Detalle del suelo y herramienta usada para desenterrar trufas (Soria).

Las características químicas y físicas de suelos truferos han sido estudiadas por varios investigadores en Europa. La información disponible para suelos truferos en España, en general concuerda con los estudios realizados en Francia e Italia.

Dentro de las características químicas, El pH es la variable principal que indica la aptitud de un suelo para el desarrollo de la trufa. Junto a esto, otras variables de importancia son el calcio total, fósforo, nitrógeno, potasio, los cationes de intercambio (Calcio y Magnesio), la materia orgánica y la relación C/N.

En cuanto a las características físicas, la variable de mayor importancia es la textura, donde los suelos truferos en Europa coinciden plenamente, eso sí con ciertos rangos de variación. Los mejores suelos para la producción de trufa son francos con variaciones franco-arcilloso, franco-arenoso o franco limoso.



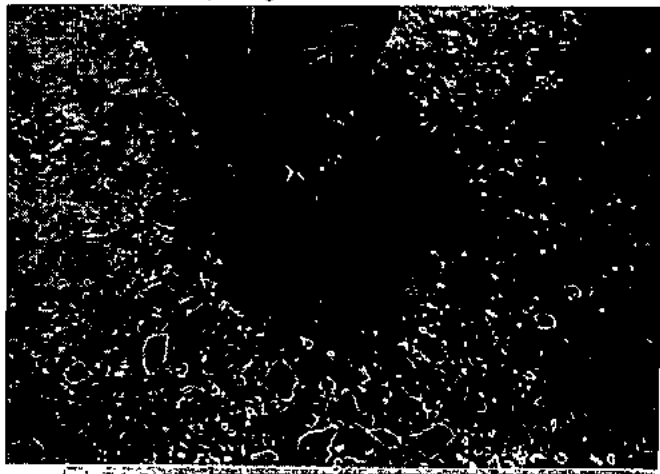
Estudios de suelo realizados por Reyna, para 9 truferas productoras en la Comunidad Valenciana, Han entregado los siguientes datos:

|                                                  |        |
|--------------------------------------------------|--------|
| pH agua 1/2.5                                    | 7.9    |
| pH CIK 1/2.5                                     | 7.4    |
| Conductividad a 25°(extracción 1/5) umhos/cm     | 166.4  |
| CO <sub>3</sub> Ca %                             | 16.8   |
| Cal. activa%                                     | 3.5    |
| MO oxidable %                                    | 3.2    |
| N total % (Kjeldahl)                             | 0.3    |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> asimilable mg/100g | 3.0    |
| K <sub>2</sub> O asimilable mg/100g              | 15.1   |
| Relación C/N                                     | 7.9    |
| Hierro total extracción:ácida %                  | 1.7    |
| Sulfatos SO <sub>4</sub> --extracción 1/5 mg/l   | 20.3   |
| Sulfatos SO <sub>4</sub> --extracción 1/5ppm     | 101.4  |
| Arena gruesa 2-0.2 mm %                          | 13.5   |
| Arena fina 0.2-0.02 mm %                         | 42.6   |
| Limo 0.02--0.002 mm.%                            | 22.6   |
| Arcilla<0.002 mm %                               | 21.3   |
| Textura                                          | Franca |

Estos datos se ajustan plenamente a los aportados por otros estudios en Europa, tanto en truferas de otras regiones de España como también en Francia e Italia.

Otra característica muy recurrente en zonas productoras de trufa en España es la pedregosidad de los suelos.

Foto 6. Detalle de la pedregosidad del suelo en una trufera en El Toro (Castellón)





La pedregosidad superficial encontrada en suelos truferos en España es una característica muy destacada por los recolectores como un indicador de la producción de trufa en monte natural. Esto se debe a que la piedra encontrada en estas zonas es caliza, lo que asegura un aporte continuo de calcio en el suelo, además mantiene el pH dentro de los rangos adecuados para la trufa. Por otra parte la pedregosidad actúa como un mulch natural manteniendo la humedad, además genera condiciones de temperatura que favorecen la producción. Esta característica es también muy valorada por los truficultores a la hora de establecer plantaciones artificiales.

Aunque la pedregosidad del suelo es una característica recurrente en truferas naturales, también existen zonas con muy buenas producciones de trufa, donde el suelo naturalmente presenta poca o ningún tipo de pedregosidad superficial (Fotos 4 y 5).

#### Especies huésped de la trufa y características de las formaciones productoras

En España, la principal especie huésped para la trufa es la encina *Quercus ilex* subesp. *ilex*, *Quercus ilex* subesp. *Ballota*) y actualmente las mejores zonas productoras se encuentran en formaciones boscosas de esta especie. La encina es sin duda la especie arbórea más representativa de la Península Ibérica, estando presente en todo el territorio debido a su amplitud ecológica. Ocupa en España una superficie próxima a los 2.500.000 ha, tanto en masas puras o como predominante en masas mixtas.



Foto 7. Formación típica de un encinar productor de trufa en Valdegeña, Soria (Castilla-León)

La encina (*Quercus ilex*) es una especie de hoja persistente, xerofítica, que resiste bien la sequía y además las bajas temperaturas, por lo tanto es muy adaptable a diferentes condiciones climáticas. Por esta razón en España esta es la principal especie trufera, tanto en monte natural como en plantaciones artificiales.

Otras especies importantes como simbioses de la trufa en España son: Quejigo (*Quercus faginea*), Coscoja (*Quercus coccifera*) y avellano europeo (*Corylus avellana*). Este último es de interés principalmente en plantaciones artificiales, y se encuentra principalmente en España como huerto frutal.

De estas especies la más valorada en la truficultura española es *Quercus ilex*, ya que es la que mejores resultados está dando en plantaciones artificiales. El avellano europeo es menos valorado



por los truficultores ya que las producciones de trufa en plantaciones con esta especie, cesan su producción al cabo de algunos años, obteniéndose luego otras especies de trufa, principalmente *Tuber Brumale*, la cual tiene muy poco valor comercial. Este hecho, actualmente se explica por que el avellano es una especie con mayor facilidad para micorizar por lo tanto es muy sensible al ingreso de otras micorizas a su sistema radical principalmente otras especies del género *Tuber*, que son más competitivas que la trufa negra.

En España, las formaciones vegetales que producen trufa presentan la peculiaridad de que son bosques abiertos sobre suelos pobres y poco evolucionados. Estos lugares se consideran en los mapas de productividad potencial como "no productivos", ya que no son aptos para la agricultura, no hay crecimientos maderables considerables y tampoco presentan pastizales adecuados para la ganadería. Sin embargo, esta afirmación sería cierta si, efectivamente, no se considerara a las trufas.

Cualquier cambio en estas condiciones extremas provoca, sin embargo, la desaparición del hongo de la trufa. De esta manera, la mayoría de los sitios productores de trufa son bordes de zonas de cultivo, zonas cultivadas antiguamente, carboneras (zonas donde se hacía carbón), caleras (zona donde se obtenía cal), zonas con intenso pastoreo, barrancos, lomas y colinas con pendiente, etc.

Estas características particulares de las áreas productoras de trufa, corresponden en general a zonas con algún grado de alteración, principalmente de origen antrópico.

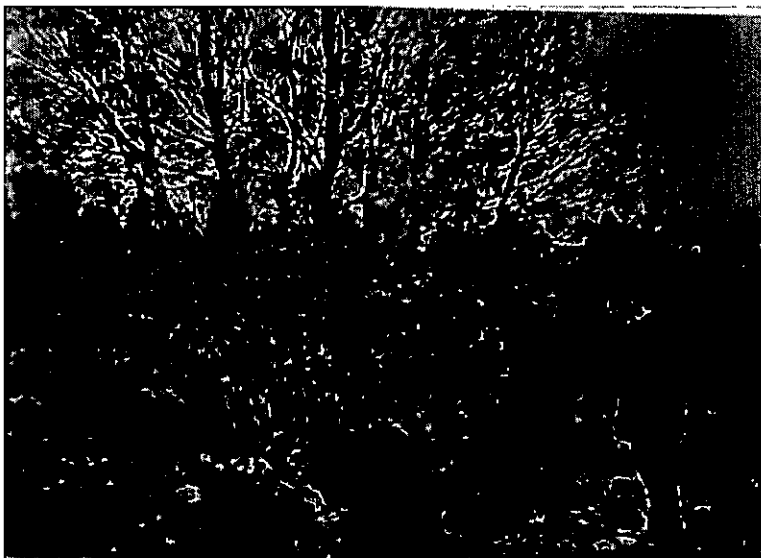


Foto 8. Formación natural de *Quercus faginea* (Quejigo) en plena producción (El Toro, castellón)



Foto 9. Búsqueda de trufas en una formación natural de *Quercus ilex* (Soria)

#### ASPECTOS DE PRODUCCIÓN Y MANEJO EN BOSQUES NATURALES PRODUCTORES DE TRUFA

En general en España, los problemas a los que se enfrenta la producción de trufa natural se pueden resumir de la siguiente forma:

- Pérdida y deterioro de su hábitat natural por abandono de prácticas tradicionales en el monte, desconocimiento del recurso y falta de iniciativas en trabajos de mejora y conservación de estas masas naturales.
- Aprovechamiento descontrolado y abusivo por una nula gestión del recurso, división de la propiedad y falta de asesoramiento e incentivos por parte de la Administración Forestal.
- Inexistencia de un sector empresarial y de servicios vinculado a la trufa que permita que los beneficios económicos del aprovechamiento del recurso repercutan en las zonas respectivas.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

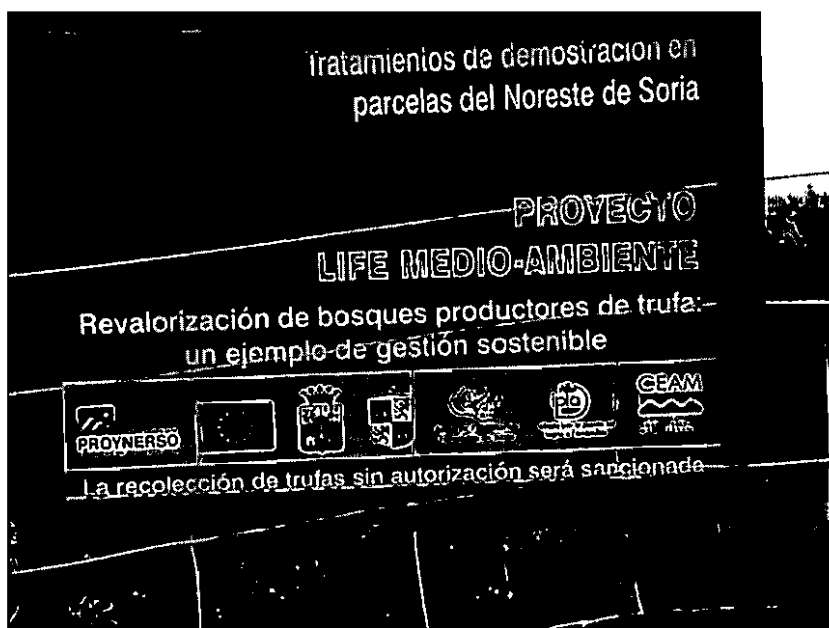


Foto 10. Proyecto LIFE Revalorización de bosques productores de trufa en Soria.

Para conocer la situación de la producción y aprovechamiento de la trufa en bosques naturales en España, se visitaron los trabajos del proyecto LIFE sobre revalorización de bosques productores de trufa en Soria (Castilla-León).

En la zona NE de Soria, el 90 % de los bosques son de titularidad privada y en todos los casos existe aprovechamiento de trufa. Un 70 % de estos bosques no tienen deslinde de propiedad, no hay división catastral de predios (se han convertido en proindivisos). La superficie media aproximada de los predios es de 500 m<sup>2</sup>.

En ningún caso existen agrupaciones de propietarios para constituir cotos o superficies extensas con aprovechamiento trufero acotado y legalizado, a excepción de los bosques Consorciados o del Catálogo de Utilidad Pública que poseen contratos de arriendo.

El único ingreso de estos bosques son las trufas. Por poner un ejemplo, en Soria la media de ingresos en bosques de utilidad pública, por concepto de arriendo cinegético es de aproximadamente 0.71US\$/ha, mientras para el aprovechamiento de las trufas es de 42 US\$/ha.

Los contratos de arriendo del aprovechamiento trufero no se respetan, por la creencia equivocada de que no se pueden poner multas y que lo que hay en el bosque "es de todos". El furtivismo es uno de los mayores daños a la sostenibilidad del recurso, junto con el aprovechamiento de terrenos libres, que nadie cuida y son objeto de aprovechamiento abusivo.

Según las investigaciones realizadas tanto en plantaciones como, recientemente, en bosque natural, la mayoría de las acciones destinadas a mejorar la producción de trufas, van enfocadas a recuperar algunos de los antiguos trabajos y aprovechamientos del bosque.

El abandono de estas prácticas tradicionales no sólo ha supuesto un problema para la persistencia de la trufa en estos bosques, sino para muchas otras especies de la fauna y flora endémicas, así





como un deterioro y regresión en la evolución de los bosques.

Aquí se describen algunos de los trabajos que se han realizado dentro del proyecto LIFE, encaminados a mejorar los bosques truferos, con buenos resultados y que pueden ser aplicados por propietarios o gestores de este tipo de formaciones en España.

El objetivo es proporcionar las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo de la trufa en detrimento de las condiciones óptimas para otros hongos antagonistas.

Los aspectos metodológicos del proyecto se centran en la realización de diversos trabajos en los bosques que, basados en prácticas ancestrales con el empleo de tecnologías modernas pero al alcance del pequeño propietario forestal, puedan fomentar la recuperación del recurso.

Cada zona de actuación fueron marcadas y señalizadas previamente. En cada una de estas zonas se marcaron parcelas de actuación y parcelas testigo. Durante las campañas de recolección de 1999-2000, 2000-2001 y 2001-2002 se ha realizado el seguimiento de la producción y de las micorrizas en cada punto. También se han realizado estudios del medio físico y natural para conocer la evolución y resultados de los trabajos que a continuación se describen:



Foto 11. Experiencias de manejo en monte natural para mejorar la producción de trufa (Soria)

#### Tratamientos silvícolas y culturales utilizados

Bajo el nombre de tratamientos silvícolas, se engloba aquellos tratamientos destinados a mejorar la estructura del dosel arbóreo y arbustivo del bosque, basados en la desaparición de la producción de trufas cuando el bosque se cierra.

Los tratamientos culturales son aquellos que se realizan sobre el medio físico, principalmente aquellos que afectan a las características y propiedades del suelo.



Ejemplos de algunos tratamientos:

a) Poda de los árboles posiblemente asociados al hongo



Foto 12. Poda de formación

Este trabajo se realiza para disminuir la densidad del follaje, y por tanto de la sombra proyectada, al tiempo que la poda de las ramas más bajas hace que esta sombra no se proyecte sobre la zona activa del hongo y se favorece su desarrollo.

Las podas de formación, tienden a que el árbol adquiera forma de cono invertido, fomentando, al mismo tiempo, su crecimiento en altura.

b) Aclareos y desbroces selectivos en anillos entorno a zonas en producción



Foto 13 Aclareo y desbroce

Los aclareos se realizan en la denominada zona de exclusión (zona cuyos árboles se encuentran en competencia con los simbiontes de la trufa, e impiden el desarrollo y crecimiento de estos). Los aclareos van acompañados de una poda de formación de los árboles sin tratar.

Los desbroces son la eliminación selectiva del matorral y las herbáceas, competidores con el hongo de la trufa por los nutrientes y el agua del suelo. Los desbroces se pueden aplicar en puntos donde el hongo ha perdido su vigor o recientemente se ha instalado en un nuevo lugar. La finalidad de estos desbroces es favorecer la implantación del hongo en el suelo.



c) Apertura de pasillos de unión entre quemados y posterior subsolado en el suelo

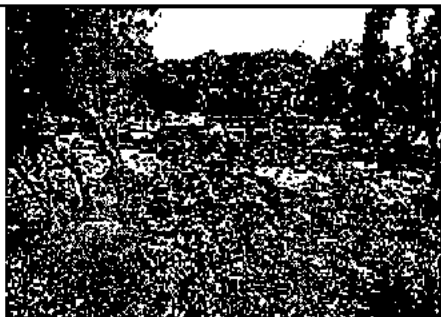


Foto 14. Formación de pasillos

Este tratamiento tiene como finalidad propiciar la expansión del hongo a otros sectores del bosque, a través de la doble acción de abrir un conducto de drenaje que lleve el agua y las posibles esporas que se hayan liberado a otras zonas en las que además, estimulamos la formación de nuevas raíces al romper las viejas.

d) Quemas lentas controladas para esterilizar el suelo



Foto 15. quema controlada

La finalidad de estas quemas es reproducir, aunque no de forma tan elaborada, las condiciones de las antiguas carboneras: esterilización del suelo, liberación lenta de residuos. Estas quemas también contribuyen a elevar el pH del suelo, lo que favorece la producción de trufas. Se ha comprobado que en sitios donde antiguamente ha habido carboneras, se forman naturalmente truferas productivas.

e) Laboreos y Mulching de la zona en producción o en posible producción

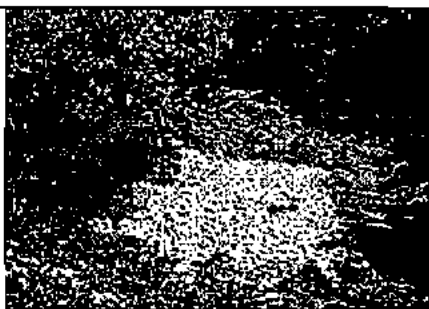


Foto 15. Mulch con piedra caliza

Los acolchados (Mulching) tienen como finalidad evitar las pérdidas de agua del suelo por evaporación en el verano. Es uno de los trabajos más sencillos y que mejores resultados ha dado a corto plazo dentro de este proyecto.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

Otros tramientos aplicados en estos trabajos son:

- f) Riego
- g) Construcción de obras para evitar erosión
- h) Inoculaciones con aportes de solución de esporas sobre zonas no productivas
- i) Recolección con distinta periodicidad y fechas de inicio y fin de campaña



Foto 16. Búsqueda y recolección de trufas



Foto 17. Trufas negras recién colectadas



INFORME ANEXO

1.7.

CUARTA PARTE

**2.4. SE OBTUVO TRUFA DE ALTA CALIDAD COMO MATERIAL BASE PARA LA INTRODUCCIÓN Y PROPAGACIÓN EN CHILE.**

La obtención de un inoculante de alta calidad es un requisito indispensable a la hora de iniciar un programa de inoculación de plantas con *Tuber melanosporum*, Vitt. En primer lugar, la época de recolección tiene que ser la adecuada, ya que se debe asegurar que las trufas tengan una maduración óptima. Otro aspecto importante es la correcta identificación de la especie, ya que en las plantaciones europeas es común la aparición de otras especies de trufas, por ejemplo *Tuber brumale* y otras, las cuales son morfológicamente similares. Por esta razón la selección del producto debe hacerse con rigurosidad para no comprometer un programa de inoculación debido a contaminaciones.

A continuación se detallan los procedimientos seguidos:

**1. Recolección trufas**

Las trufas se recolectaron en una plantación de propiedad privada, situada en el Término municipal de El Toro, Provincia de Castellón, España. Dicha plantación ocupa una extensión aproximada de una hectárea y tiene una edad que pasa de los treinta años. Está formada por árboles de *Quercus ilex* ssp *ballota*, se encuentra a una altitud de 1000 metros, el clima de aquella zona es Mediterráneo continental con termoclima supramediterráneo inferior y ombroclima seco con tendencia al subhúmedo. El suelo es de reacción básica (calcáreo) y de textura franca.

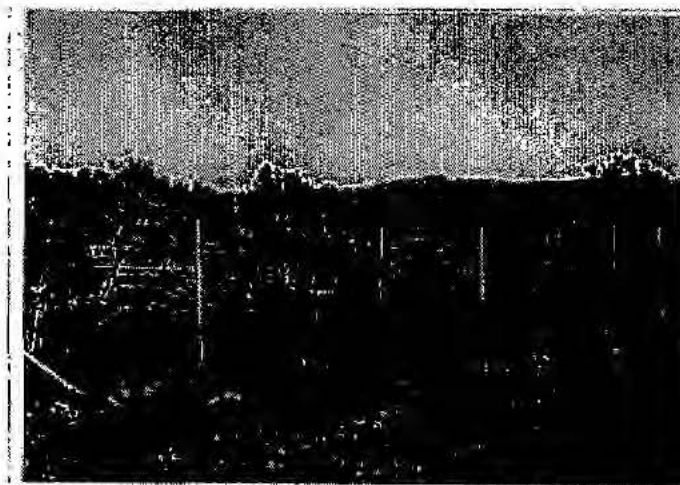


Foto 1: Plantación trufera (El Toro, Castellón, España)

En total se recolectaron tres kilogramos de trufa los días 18 y 25 de enero del 2002. El número total de carpóforos fue de 81, con diámetros que oscilaron entre los 2.5 cm y los 10.5 cm.



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85



Foto 2: Recolección de trufas

La recolección se realizó con ayuda de un perro especialmente adiestrado de propiedad del truficultor.

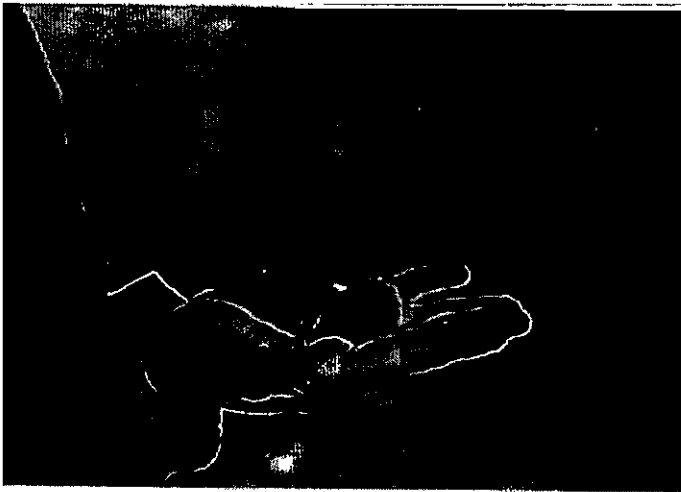


Foto 3. Trufas frescas recién recolectadas



Foto 4. Trufas negras antes de su procesamiento

## 2. Limpieza y esterilización

Una vez trasladadas las trufas al laboratorio, se procedió a realizar su limpieza y desinfección, para ello se cepilló cada uno de los carpóforos cuidadosamente hasta eliminar por completo toda la tierra y piedras pequeñas adheridas al peridio (cubierta). Tras ello se les dio un baño con una solución de hipoclorito de sodio al 5% para desinfectarlas. Tras este tratamiento se volvieron a pesar los carpóforos, el peso total pasó a ser de 2620 gramos.

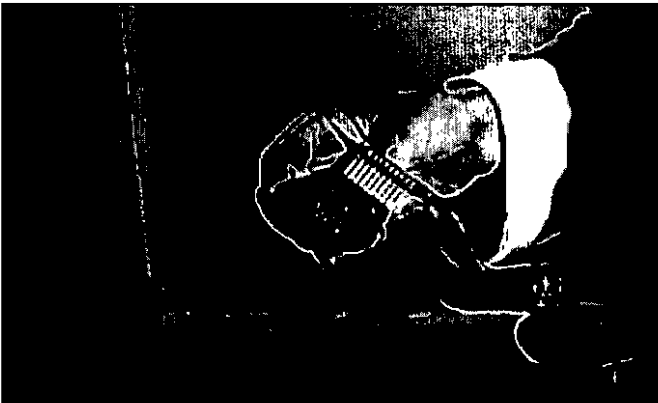


Foto 4. Limpieza de los ascocarpos de trufa negra

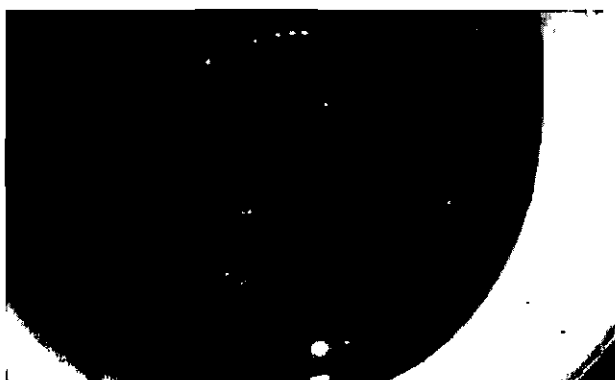


Foto 5 Desinfección de las trufas en una solución de hipoclorito sódico

### 3. Identificación

Tras su limpieza y desinfección se preparó una muestra, sobre un porta-objetos, de una pequeña porción de la gleba para confirmar por medio de la visualización de las esporas la especie con la que tratábamos. Esta preparación se observó mediante microscopio compuesto a 40x y se identificaron las esporas de *Tuber melanosporum*, Vitt., con la ayuda de bibliografía especializada y claves morfológicas.

El análisis y confirmación de especie mediante el estudio de características anatomorfológicas en las trufas cumple un rol fundamental para la obtención de un inoculante de alta pureza. Como ejemplo durante los análisis de las trufas recolectadas en España, se identificó solamente un ejemplar de una especie considerada contaminante (*Tuber brumale*), la cual fue desechada inmediatamente.



Foto 6. Detalle de una trufa contaminante (*Tuber brumale*) detectada en el análisis





Foto 6: Clasificación de trufas (*Tuber melanosporum*)

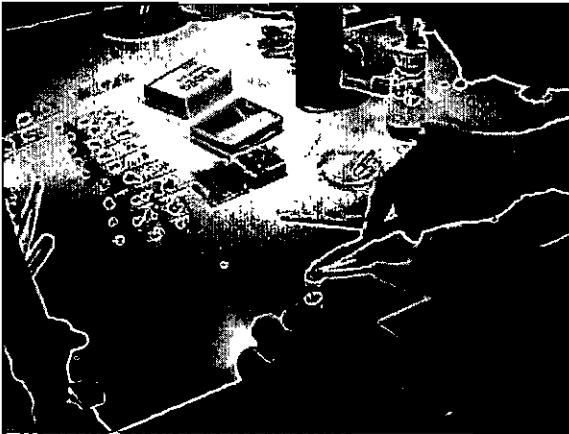


Foto 7: Preparación de las muestras

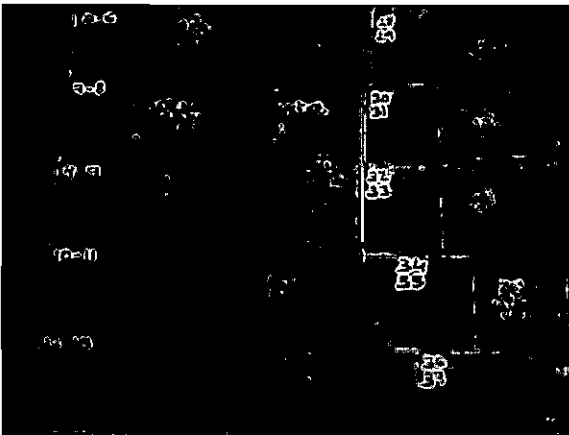


Foto 8: Preparaciones de esporas



Las características de las esporas de *Tuber melanosporum* coincidieron plenamente con las expuestas en la bibliografía especializada:

|                                   |                                            |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| Tipo de las ascas                 | globosas, pedunculadas                     |
| Tamaño del eje menor del asca     | 80-120 $\mu$                               |
| Tamaño del eje mayor del asca     | 90-140 $\mu$                               |
| Número de esporas por asca        | entre 1 y 6                                |
| Tamaño del eje mayor de la espora | 29-35 $\mu$                                |
| Tamaño del eje menor de la espora | 20-26 $\mu$ .                              |
| Forma de la espora                | elíptica                                   |
| Ornamentación                     | con espinulas cortas rígidas y muy densas. |
| Color de las esporas              | marrón oscuro.                             |



Foto 8: Análisis microscópico



De cada trufa se hizo una preparación de esporas, se analizaron y se tomaron fotografías.



Foto 10: Esporas de *Tuber melanosporum*, (40X)

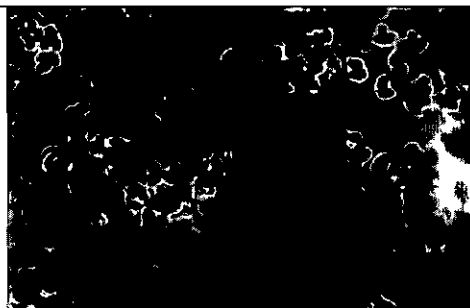
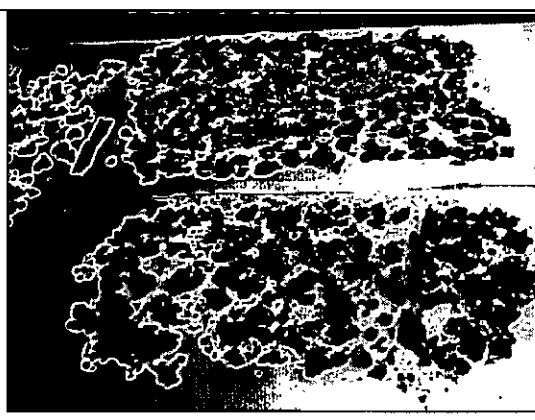
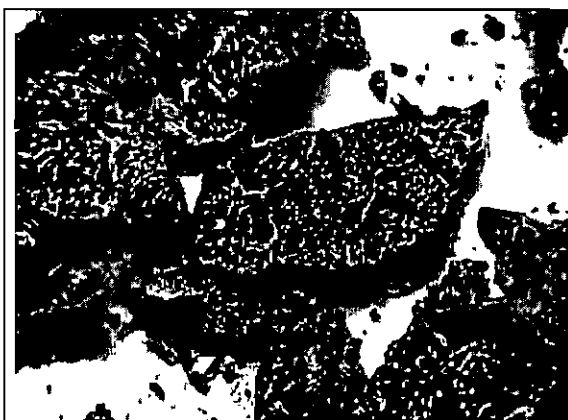


Foto 11. Esporas de *T. m.* (Magnificación 10X)

#### 4. Procesamiento

Una vez identificados los cuerpos fructíferos se laminaron para facilitar su secado, este se realizó a temperatura ambiente sobre papel secante, dentro del laboratorio.



Fotos 12 y 13 . Detalle de trufas seleccionadas y laminadas para su secado a temperatura ambiente

Para su conservación hasta el momento en que se utilizará para preparar el inóculo se colocaron todas las porciones de trufa en un recipiente de polietileno de alta densidad y se almacenaron en un lugar fresco y seco.

#### 5. Bibliografía

Astier J. "*Truffles blanches et noires*", 1998 pp: 68,69 Ed. Louis-Jean  
Reyna, S. "*Trufa, Truficultura y Selvicultura trufera*", 2000 pp: 42 Ed. Mundi-Prensa  
RiOUSset, G.; Chevalier, G.; Bardet, M.C. "*Truffles d'Europe et de Chine*" 2001 pp: 66,67. Ed. Inra editions



INFORME ANEXO 1.8.

QUINTA PARTE

2.5 SE ESTABLECIERON CONTACTOS CON CIENTÍFICOS, TÉCNICOS Y PRODUCTORES QUE TRABAJAN EN TRUFICULTURA EN ESPAÑA.

ITINERARIO DESARROLLADO Y CONTACTOS ESTABLECIDOS EN LA GIRA

| Día    | Lugar                             | Actividades                                                                                                                                                                                                                                                                         | Contactos establecidos                                                  |
|--------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 16 ene | Avión                             | Viaje                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                         |
| 17 ene | Valencia                          | Instalación en hotel en Valencia                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                         |
| 18 ene | Valencia                          | Visita a Fundación CEAM y reunión de trabajo del proyecto.                                                                                                                                                                                                                          | a) M. Millán<br>b) Ramon Vallejo<br>c) Santiago Reyna<br>d) Laura Folch |
| 19 ene | Valencia<br>Castellón<br>Valencia | Visita a Plantaciones truferas, bosques naturales productores de trufa en Castellón (El Toro, Barracas), recolección de trufas para internar a Chile. Reunión con presidente de truficultores de Castellón.<br>Visita a vivero de producción de planta trufera en Viver (Castellón) | e) Eliseo Palomar,<br>f) Jose Luis Carbó,                               |
| 20 ene | Valencia                          | Día libre                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                         |
| 21 ene | Valencia<br>Zaragoza<br>Soria     | Visita Centro Investigación (SIA. Servicio de Investigación Agroalimentaria) en Zaragoza, Gobierno de Aragón. Reunión de trabajo con el Dr. Carlos Palazón, visita a plantación trufera experimental, laboratorios y viveros de producción de planta trufera                        | g) Carlos Palazón<br>h) Juan Barriuso<br>i) Antonio Delgado             |
| 22 ene | Soria<br>Soria                    | Visita Centro de Investigación Forestal de Valonsádero en Soria. Reunión con investigadores y directora del Centro Dra. Ana Hernández. Visita a trabajos proyecto LIFE y trufas naturales, cosechas de trufas                                                                       | j) Ana Hernández                                                        |
| 23 ene | Soria<br>Villaciervos<br>Pamplona | Visita operaciones de empresa Arotz-Catesa en Villaciervos (plantación 700 hectáreas), viveros y comercialización. Reunión con Gerente operaciones D. Pedro Carbajo.                                                                                                                | k) Pedro Carbajo                                                        |
| 24 ene | Pamplona<br>Pamplona              | Reunión con equipo de trabajo de truficultura, Universidad de Navarra (Depto Botánica) e Instituto Técnico de Gestión Agrícola                                                                                                                                                      | l) A. M. de Miguel<br>M. Luisa Etayo<br>Reimundo Saez                   |
| 25 ene | Pamplona<br>Pamplona              | Visita a plantaciones truferas en Navarra                                                                                                                                                                                                                                           | A. de Miguel<br>R. Saez                                                 |
| 26 ene | Pamplona<br>Valencia              | Regreso a Valencia                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                         |
| 27 ene | Valencia                          | Día libre                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                         |
| 28 ene | Valencia                          | Visita banco de semillas y viveros forestales de Quart de Poblet.                                                                                                                                                                                                                   | m) Antoni Marzo                                                         |
| 29 ene | Valencia                          | Reuniones de trabajo en Fundación CEAM                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                         |
| 30 ene | Valencia                          | Reuniones Conselleria de medioambiente de la Comunidad valenciana y Universidad Politécnica de Valencia Reunión de trabajo con investigadores y técnicos del Gobierno Regional Valenciano.                                                                                          | n) Juan Uriol<br>Luis Velasco<br>F. Galiana                             |



FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
Proyecto C01-1-A-85

#### AFILIACIÓN DE LOS CONTACTOS ESTABLECIDOS EN ESPAÑA

- a) Director Ejecutivo Fundación CEAM, Valencia, España **millan@ceam.es**
- b) Director Programa Investigación Forestal, Fundación CEAM **ramonv@ceam.es**
- c) Investigador asociado al proyecto, Programa Truficultura, Fundación CEAM **santiago@ceam.es**
- d) Investigador y apoyo técnico Proyecto Truficultura, Fundación CEAM **laura@ceam.es**
- e) Viverista, productor de planta micorizada (Vivertruf), Presidente de la Asociación de Recolectores y Cultivadores de trufa de Castellón, España.
- f) Viverista, productor de planta micorizada, Viver, Castellón España
- g) Dr. Ingeniero Agrónomo, Jefe grupo de trabajo en truficultura, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Unidad de Sanidad Vegetal, Zaragoza, Gobierno de Aragón, España. **cpalazon@aragob.es**
- h) Técnico, grupo de trabajo truficultura, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Unidad de Sanidad Vegetal, Zaragoza, Gobierno de Aragón.
- i) Universidad de Zaragoza. Esc. Politécnica de Huesca, Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Huesca, España. **barriuso@posta.unizar.es**
- j) Directora Centro de Investigación Forestal de Valonsadero, Soria **valonsad@ctv.es**
- k) Gerente técnico empresa Arotz-Catesa, Navaleno, Soria **navaleno@arotz.es**
- l) Dra. Grupo de trabajo de truficultura, Depto Botánica-Fac. Ciencias, Universidad de Navarra, Pamplona. **amiguel@unav.es**
- m) Banco de Semillas Forestales, Quart de poblet, Valencia. **banc.llavors@cma.m400.gva.es**
- n) Jefe del Servicio de Gestión Forestal, Conselleria de Medioambiente, Generalitat Valenciana. **juan.uriol@cma.m400.gva.es**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL MAULE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES**  
**ESCUELA DE INGENIERIA FORESTAL**

ANEXO 2

**MICORRIZACIÓN ENTRE *Tuber melanosporum* Vittadini  
Y CUATRO ESPECIES DE LA FAMILIA *FAGACEAE***

Profesor Guía: Francisco J. Pérez Muñoz

Informe presentado como parte de los  
requisitos para optar al Título de  
Ingeniero Forestal.

**MARÍA N. BRUNEL SALDÍAS**  
**MARIELA F. FLORES DÍAZ**

TALCA – CHILE  
2003

## RESUMEN

El estudio pretendió determinar la factibilidad de obtener plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* Vittadini, bajo dos ambientes de cultivo (invernadero con condiciones controladas y al aire libre), utilizando métodos y tecnologías apropiadas que permitan un alto nivel de micorrización.

La investigación se realizó en el vivero de la Universidad Católica del Maule donde se evaluó la micorrización controlada con *T. melanosporum* de las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus glauca* y *Nothofagus obliqua* en dos ambientes de cultivo. Se utilizó el método de inoculación en seco y el análisis del grado de micorrización fue a través de un muestreo volumétrico.

El primer ensayo se realizó en un invernadero con condiciones controladas cuya población fue de 54 plantas/especie, el cual se evaluó a través de un análisis de varianza para un diseño en bloques al azar simple, además de un análisis estadístico descriptivo. El segundo ensayo, realizado al aire libre, consideró 4 tratamientos diferenciados por las especies nativas (*N. glauca* y *N. obliqua*) y los niveles de pH del sustrato; el ensayo se instaló de acuerdo a un diseño en bloques al azar simple, con 3 repeticiones/tratamiento representado por 54 plantas/tratamiento.

Del análisis de los niveles de micorrización efectuado se observó que bajo condiciones controladas las especies *Q. ilex*, *Q. robur* y *N. obliqua* lograron resultados positivos de micorrización, además de haber sido no significativa o nula la presencia de otras micorrizas; sólo *N. glauca* presenta bajos niveles de micorrización con este hongo. Con el ensayo realizado al aire libre se ratifica que la eficacia de la micorrización depende de las condiciones de asepsia y pH requeridas por el hongo.

## SUMMARY

The present study sought to determine the feasibility of obtaining micorrhized plants with *Tuber melanosporum* Vittadini, under two cultivation atmospheres (greenhouse with controlled conditions and outdoors), suitable methods and technologies that allow an acceptable micorrization level.

The survey was carried out in the nursery trees belonging to Catholic University of Maule, where *Tuber melanosporum* micorrization was evaluated with *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus glauca* and *Nothofagus obliqua* species in two cultivation atmospheres. The inoculation method used was the dry one and the micorrization levels analysis was carried out through a volumetric sample.

The first trial was carried out in a nursery tree under controlled conditions whose population was of 54 plants/species, which was evaluated through a variance analysis for a simple random block design, besides of a descriptive statistical analysis. The second one, outdoors, considered 4 treatments that differed by the native species (*N. glauca* y *N. obliqua*) and the pH substrate level; the trial was installed according to a design, consisting in simple at random blocks, with 3 repetitions/treatment represented by 54 plants/treatment.

From the micorrization level analysis it's clear that under controlled condition *Q. ilex*, *Q. robur* and *N. obliqua* species got positive micorrization results, besides having not been significant or null the presence of other micorrizas; only *N. glauca* shows low micorrization levels with this fungus. With the outdoors trial it's ratified that micorrization effectiveness depends on the aspeis conditions requerided by the fungus.



# ÍNDICE GENERAL DE MATERIAS

|                                                                             | Pág       |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                   | <b>3</b>  |
| 2.1. Objetivo General .....                                                 | 3         |
| 2.2. Objetivos Específicos .....                                            | 3         |
| <b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                      | <b>4</b>  |
| 3.1. Ectomicorizas .....                                                    | 4         |
| 3.1.1. Desarrollo y estructuras de ectomicorizas .....                      | 5         |
| 3.1.2. Beneficios de la asociación ectomicorrícica .....                    | 8         |
| 3.2. El género <i>Tuber</i> en la sistemática micológica .....              | 9         |
| 3.2.1. Biología y ecología de <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini .....     | 10        |
| 3.2.1.1. Aspectos del cuerpo fructífero .....                               | 10        |
| 3.2.1.2. Aspectos de la micorriza .....                                     | 12        |
| 3.3. Simbiontes naturales de <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini .....      | 13        |
| 3.4. La micorrización con <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini .....         | 13        |
| 3.4.1. Técnicas de micorrización .....                                      | 14        |
| 3.4.2. Métodos de inoculación con <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini ..... | 14        |
| 3.4.3. Control cuantitativo de las micorizas .....                          | 15        |
| 3.4.4. Factores ecológicos relacionados a la micorrización .....            | 16        |
| 3.5. Principios y condiciones del cultivo .....                             | 16        |
| 3.5.1. Condiciones geográficas .....                                        | 17        |
| 3.5.2. Condiciones climáticas .....                                         | 17        |
| 3.5.3. Condiciones edáficas .....                                           | 17        |
| 3.6. Ciclo biológico de la trufa .....                                      | 19        |
| 3.7. Especies simbiontes potenciales en Chile .....                         | 21        |
| 3.7.1. <i>Nothofagus glauca</i> (Phil.) Krasser .....                       | 22        |
| 3.7.2. <i>Nothofagus obliqua</i> var <i>obliqua</i> (Mirb) Oerst. ....      | 22        |
| 3.7.3. <i>Quercus ilex</i> L. subsp. <i>ballota</i> (Desf) Samp. ....       | 23        |
| 3.7.4. <i>Quercus robur</i> L. ....                                         | 23        |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>                                           | <b>24</b> |
| 4.1. Materiales .....                                                       | 24        |
| 4.2. Metodología .....                                                      | 26        |
| 4.2.1. Inoculación y transplante .....                                      | 26        |
| 4.2.2. Niveles de micorrización .....                                       | 27        |
| 4.2.3. Diseño experimental .....                                            | 29        |

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>                                                             | <b>31</b> |
| 5.1. Micorrización con <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini, en invernadero                                        | 31        |
| 5.2. Micorrización con <i>Tuber melanosporum</i> Vittadini, al aire libre ...                                     | 34        |
| 5.3. Otras micorrizas del estudio .....                                                                           | 37        |
| 5.3.1. Fotos de las otras micorrizas del estudio .....                                                            | 39        |
| 5.4. Fotos de los morfotipos de las micorrizas de<br><i>Tuber melanosporum</i> para las especies en estudio ..... | 41        |
| <b>6. CONCLUSIONES .....</b>                                                                                      | <b>45</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                                                                      | <b>47</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                               | <b>51</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                 | Pág |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla N°1.-</b> Tipos de simbiosis entre organismos.....                                                                     | 4   |
| <b>Tabla N°2.-</b> Características de las principales especies del género <i>Tuber</i> ..                                       | 10  |
| <b>Tabla N°3.-</b> Especies que forman asociaciones ectomicorrícicas<br>con <i>Tuber melanosporum</i> .....                     | 13  |
| <b>Tabla N°4.-</b> Rangos de temperaturas óptimas propuestos para la trufa.....                                                 | 17  |
| <b>Tabla N°5.-</b> Características de los terrenos recomendados para el<br>cultivo de trufa negra.....                          | 19  |
| <b>Tabla N°6.-</b> Especies presentes en la zona centro sur de Chile, factibles<br>de formar asociaciones ectomicorrícicas..... | 21  |
| <b>Tabla N°7.-</b> Análisis de suelo de los sustratos.....                                                                      | 26  |
| <b>Tabla N°8.-</b> Diseño del Ensayo I, para cada Bloque (N° de bloques=3).....                                                 | 30  |
| <b>Tabla N°9.-</b> Diseño del Ensayo II, para cada Bloque (N° de bloques=3).....                                                | 30  |
| <b>Tabla N°10.-</b> N° total de ápices radicales evaluados por especie, ensayo I.                                               | 31  |
| <b>Tabla N°11.-</b> Promedio de ápices radicales evaluados por especie,<br>ensayo I.....                                        | 32  |
| <b>Tabla N°12.-</b> Mortalidad de las especies, ensayo I.....                                                                   | 33  |
| <b>Tabla N°13.-</b> Test de Duncan, con 95% de significancia.....                                                               | 34  |
| <b>Tabla N°14.-</b> N° total de ápices radicales evaluados por tratamiento,<br>ensayo II.....                                   | 34  |
| <b>Tabla N°15.-</b> Promedio de ápices radicales evaluados por tratamiento,<br>ensayo II.....                                   | 35  |
| <b>Tabla N°16.-</b> Mortalidad de las especies para cada tratamiento, ensayo II..                                               | 36  |
| <b>Tabla N°17.-</b> Test de Duncan, con 95 % de significancia.....                                                              | 37  |
| <b>Tabla N°18.-</b> Morfotipos de las otras micorrizas encontradas en el estudio.                                               | 38  |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                     | Pág |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura N°1.-</b> Vista microscópica de una micorriza formada entre<br><i>Betula alleghaniensis</i> y <i>Pisolithus tinctorius</i> .....                          | 6   |
| <b>Figura N°2.-</b> Dibujos esquemáticos de la superficie de mantos<br>plectenquimáticos (A-I) y mantos pseudoparenquimáticos<br>(K-Q), basados en superficies..... | 7   |
| <b>Figura N°3.-</b> Diagrama de una micorriza de <i>Tuber melanosporum</i> .....                                                                                    | 12  |
| <b>Figura N°4.-</b> Esquema del ciclo biológico de la trufa, en Europa.....                                                                                         | 20  |
|                                                                                                                                                                     |     |
| <b>Gráfico N°1.-</b> Porcentajes de micorrización con <i>Tuber melanosporum</i> ,<br>ensayo I.....                                                                  | 32  |
| <b>Gráfico N°2.-</b> Porcentajes de micorrización con <i>Tuber melanosporum</i> ,<br>ensayo II.....                                                                 | 36  |

## ÍNDICE DE FOTOS

|                                                                                 | Pág |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Foto N° 1.- Cuerpo fructífero de la trufa negra.....                            | 11  |
| Foto N° 2.- Detalle de la gleba de la trufa negra.....                          | 11  |
| Foto N° 3.- Esporas de <i>Tuber melanosporum</i> en el interior de un asca..... | 11  |
| Foto N° 4.- Plantas de hualo, previo a la inoculación.....                      | 27  |
| Foto N° 5.- Plantas de hualo inoculadas.....                                    | 27  |
| Foto N° 6.- Contenedor.....                                                     | 28  |
| Foto N° 7.- Sacabocado.....                                                     | 28  |
| Foto N° 8.- Toma de muestra.....                                                | 28  |
| Foto N° 9.- Muestra extraída.....                                               | 28  |
| Foto N° 10.- Micorriza Tipo A1.....                                             | 39  |
| Foto N° 11.- Manto micorriza Tipo A1.....                                       | 39  |
| Foto N° 12.- Micorriza Tipo A2.....                                             | 39  |
| Foto N° 13.- Rizomorfo micorriza Tipo A2.....                                   | 39  |
| Foto N° 14.- Micelio y rizomorfo del Tipo A2.....                               | 39  |
| Foto N° 15.- Raíz micorrizada con Tipo A1-A3.....                               | 39  |
| Foto N° 16.- Micorriza Tipo A3.....                                             | 40  |
| Foto N° 17.- Manto micorriza tipo A3.....                                       | 40  |
| Foto N° 18.- Rizomorfo micorriza Tipo A3.....                                   | 40  |
| Foto N° 19.- Cistidios de micorriza Tipo A3.....                                | 40  |
| Foto N° 20.- Micorriza Tipo A4.....                                             | 40  |
| Foto N° 21.- Micorriza Tipo A4.....                                             | 40  |
| Foto N° 22.- Micorriza joven de <i>Tuber melanosporum</i> .....                 | 41  |
| Foto N° 23.- Manto en puzzle.....                                               | 41  |
| Foto N° 24.- Cistidios de la micorriza.....                                     | 41  |
| Foto N° 25.- Micorriza adulta de <i>Tuber melanosporum</i> .....                | 41  |
| Foto N° 26.- Cistidios de micorriza adulta.....                                 | 41  |
| Foto N° 27.- Raíz micorrizada, sección I.....                                   | 42  |
| Foto N° 28.- Raíz micorrizada, sección II.....                                  | 42  |
| Foto N° 29.- Cistidios en ángulo recto.....                                     | 42  |
| Foto N° 30.- Aglomeración de micorriza de <i>Tuber melanosporum</i> .....       | 42  |

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Foto N° 31.-</b> Aglomeración de micorriza de <i>Tuber melanosporum</i> ..... | <b>43</b> |
| <b>Foto N° 32.-</b> Micorrizas de <i>Tuber melanosporum</i> .....                | <b>43</b> |
| <b>Foto N° 33.-</b> Cistidios de la micorriza.....                               | <b>43</b> |
| <b>Foto N° 34.-</b> Micorriza de <i>Tuber melanosporum</i> .....                 | <b>43</b> |
| <b>Foto N° 35.-</b> Manto en puzzle.....                                         | <b>43</b> |
| <b>Foto N° 36.-</b> Red superficial de hifas.....                                | <b>44</b> |

## 1. INTRODUCCIÓN

La crisis comercial y productiva que afecta especialmente a los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario y la fuerte competencia en los mercados, hace necesario el desarrollo de nuevas opciones productivas apropiadas a las condiciones agroecológicas del país.

La producción de hongos comestibles en bosques y matorrales constituye una importante riqueza forestal, aunque con frecuencia ignorada y poco valorada; el comercio de estos hongos está adquiriendo cada día mayor importancia en el ámbito económico, ambiental y social, siendo un producto de alto valor agregado en el sector agroforestal (Martínez de Aragón *et al.*, 1998).

Las trufas constituyen una de las especies de hongos más cotizadas que viven en simbiosis con raíces de árboles forestales. Estos hongos micorrícicos tienen un alto valor en el mercado mundial, lo que se debe a su fuerte y agradable aroma, siendo en áreas silvestres particularmente difícil y escasa su cosecha. En particular, la trufa negra del Perigord (*Tuber melanosporum* Vittadini) junto al azafrán, caviar y foie gras es calificada como uno de los productos más apreciados de la gastronomía internacional.

El valor económico, social y ecológico de la producción trufera en Europa es significativo e indiscutible. A pesar de ello, la producción natural se reduce notablemente cada año, siendo las plantaciones artificiales de la trufa negra la única alternativa de conservación para este producto, que en la temporada 2001-2002 ha alcanzado precios de US\$ 700/kg en el mercado francés.

A pesar de ser *T. melanosporum* uno de los pocos hongos ectomicorrícicos que se ha podido cultivar en forma artificial, su cultivo y comercialización, hasta hoy, ha sido logrado por unos pocos países. Francia, Italia y España dominan el mercado trufero mundial, introduciéndose últimamente a Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia donde ya existen truferas en producción. Además se conocen trabajos en Israel y Sudáfrica, mientras que la producción en Sudamérica es incierta, con algunas experiencias en Argentina.

El cultivo de trufa negra se presenta en el país como una interesante alternativa productiva, ya que existen claras oportunidades de mercado en Europa, donde este producto tiene una alta demanda y una producción que no satisface la oferta actual, existiendo ventajas comerciales para Chile al permitir una oferta contra temporada en los mercados tradicionales. Además, el país presenta zonas adecuadas para la truficultura, principalmente en la zona centro-sur, donde sus favorables condiciones edafoclimáticas pueden ser complementadas por prácticas agronómicas. Sin embargo, se deben definir con más detalle las zonas ecológicamente aptas para el cultivo, según los requerimientos del hongo y las diferentes especies simbiotes.

La especificidad que presenta el género *Tuber* con especies de la familia *Fagaceae* es un factor clave para elegir el fitosimbionte a utilizar. En el país se han introducido algunas especies que son simbioses naturales, ya adaptadas a condiciones ecológicas locales, como *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Además, dentro de la flora nativa se pueden encontrar especies de esta familia, pertenecientes al género *Nothofagus*, que forman asociaciones micorrícicas con una variedad de hongos de ectomicorriza en las áreas de distribución natural.

La micorrización controlada en vivero y su efecto en los procesos de reforestación en distintos países y condiciones ecológicas, ha sido ampliamente estudiada y revisada. Actualmente no existen dudas de que los hongos ectomicorrícicos son un componente esencial en los ecosistemas forestales (Vogt et al., 1991 citado por Pera et al., 1998), sin embargo, a pesar de su importancia, los estudios resultan insuficientes y escasos.

El estudio busca estudiar la micorrización controlada entre *T. melanosporum* y cuatro especies de la familia *Fagaceae* (*Q. ilex*, *Q. robur*, *Nothofagus glauca* y *Nothofagus obliqua*), evaluando la factibilidad de producir plantas hospederas con significativos niveles de micorrización. Con los resultados obtenidos se abrirán nuevas expectativas y posibilidades para el desarrollo agroforestal, aunque deberán ser reafirmadas por nuevas experimentaciones.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

- Evaluar la micorrización con *Tuber melanosporum* Vittadini, de cuatro especies de la familia *Fagaceae* bajo condiciones de invernadero y aire libre, con el fin de obtener una nueva alternativa de producción para el sector agroforestal.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar los niveles de micorrización, en las especies *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf) Samp., *Quercus robur* L., *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. y *Nothofagus obliqua* var *obliqua* (Mirb) Oerst., inoculadas con *T. melanosporum*; bajo condiciones óptimas de cultivo en invernadero.
- Evaluar los niveles de micorrización, en las especies *N. glauca* y *N. obliqua* inoculadas con *T. melanosporum*; cultivadas en sustrato de bosque de *Nothofagus*, bajo dos niveles de pH, al aire libre.
- Conocer la respuesta de *T. melanosporum* frente a la competencia de hongos ectomicorrícicos en sustrato natural sin esterilizar, bajo diferentes niveles de pH.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Ectomicorrizas

En la simbiosis, ciertos organismos se han adaptado a vivir en íntima y continua asociación con alguna otra forma de vida, para afrontar la competencia biológica. La principal característica de esta unión de organismos distintos, es que siempre los dos miembros de la asociación salgan beneficiados (Schlegel, 1988 citado por Venegas, 2003).

Según Allen (1991); De Bary (1887) citados por Etayo y de Miguel (1998) reconocieron varios tipos de simbiosis, incluyendo parasitismo, comensalismo, amensalismo, neutralismo y mutualismo. La tabla N°1 indica los tipos de simbiosis entre organismos según la relación entre éstos, sea positiva, negativa o neutra.

Tabla N°1.- Tipos de simbiosis entre organismos.

| ESPECIE 2 | ESPECIE 1    |              |             |
|-----------|--------------|--------------|-------------|
|           | +            | 0            | -           |
| +         | MUTUALISMO   | COMENSALISMO | PARASITISMO |
| 0         | COMENSALISMO | NEUTRALISMO  | AMENSALISMO |
| -         | PARASITISMO  | AMENSALISMO  | ANTAGONISMO |

Fuente: Allen, 1991

Entre las relaciones positivas para ambos individuos se encuentra la asociación micorrícica que es, según Allen (1991) citado por Etayo y de Miguel (1998) "una simbiosis mutualista entre la planta y el hongo localizada en una estructura similar a la raíz en la que compuestos de carbono se mueven primariamente de la planta al hongo y los recursos inorgánicos se mueven desde el hongo a la planta. Esta asociación se encuentra en un amplio rango de hábitats, desde acuáticos a desérticos, bosques tropicales, extremas latitudes y altitudes".

Como resultado de esta asociación simbiótica, las plantas micorrícicas son más competitivas y con mayor capacidad para tolerar el estrés medioambiental, que las plantas no micorrícicas (Sylvia, 1997 citado por Ipinza y Grange, 1986)

En general, los grupos fundamentales de micorrizas, son las ectomicorrizas y las endomicorrizas, términos que fueron acuñados por Frank en 1887, y que en la actualidad aún se consideran válidos. El tercer tipo, las ectoendomicorrizas, es menos frecuente y de menor importancia (Etayo y de Miguel, 1998).

Aunque existen unas pocas familias de especies vegetales que no forman micorrizas, se sostiene que el 95% de las especies de plantas vasculares presentes en el mundo tiene el potencial de formar este tipo de simbiosis. A pesar de que sólo un 3 a 5% de las especies vasculares presentan ectomicorrizas, es el tipo más común que se presenta en bosques templados y boreales que cubren

superficies extensas, particularmente en el hemisferio norte (Ipinza y Grange, 1983).

Numerosos son los hongos que pueden comprometerse en asociaciones ectomicorrícicas en un bosque, permitiendo a una especie arbórea poder ser micorrizada por una diversidad de especies de hongos. Estudios con los géneros de árboles como *Eucalyptus*, *Nothofagus* y *Pseudotsuga* muestran que cada una tiene una extensa asociación con hongos específicos (Ipinza y Grange, 1983; Smith y Read 1997).

También está el caso de una especie de hongo ectomicorrícico que se asocie a numerosos árboles, tales como *Amanita muscaria*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris* que tienen una distribución mundial en un amplio rango de plantas (Ipinza y Grange, 1983; Smith y Read 1997).

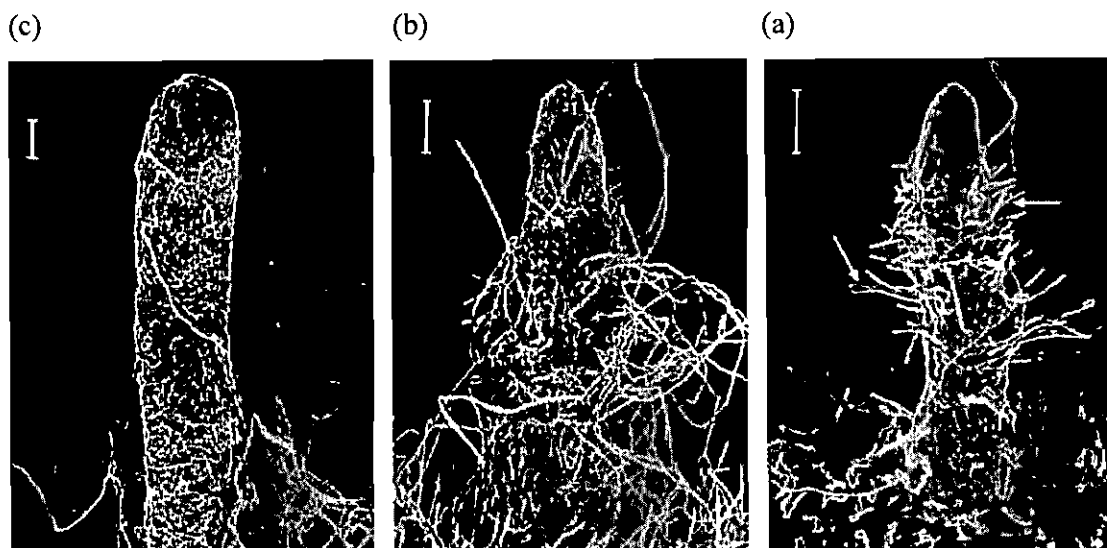
Las *Pinaceae*s, especies que forman el mayor componente de los vastos bosques boreales del Hemisferio Norte, las *Fagaceae*s, dominantes de los bosques templados del Norte, y las *Mirtaceae*s, su contraparte en las regiones templadas y subtropicales del hemisferio sur, son las principales familias en las cuales predominan las especies ectomicorrícicas. También se mencionan las *Betulaceae*, *Tiliaceae*, *Juglandaceae*, *Salicaceae*, *Ulmaceae*, *Corylaceae* y *Rosaceae* (Etayo y de Miguel, 1998; Smith y Read 1997).

La ectomicorriza se caracteriza por la presencia de tres componentes estructurales: una vaina o manto de tejido fúngico que envuelve a la raíz, un crecimiento interno de hifas entre las células epidermales y corticales llamada red de Hartig, y exteriormente un sistema creciente de elementos de hifas que forman conexiones esenciales con el sustrato y con los cuerpos fructíferos de los hongos (Smith y Read, 1997).

### **3.1.1. Desarrollo y estructuras de ectomicorrizas**

La formación de la ectomicorriza es originada por esporas o hifas del hongo simbiote que se encuentran en la rizósfera radical. La infección es estimulada por las exudaciones radicales, ya que éstas atraen al hongo quimotácticamente y promueven el desarrollo y crecimiento de las hifas sobre la superficie de las raíces cortas, formando una cubierta compacta o manto (Ipinza y Grange, 1983).

Desde el manto, las hifas del hongo simbiote penetran entre las células externas del cortex, formando una red continua de hifas entre las células corticales, sin penetración intracelular, llamada "red de Hartig", que es el elemento más distintivo de las ectomicorrizas (Etayo y de Miguel, 1998). Las etapas principales del desarrollo del manto fúngico se muestran en la figura N°1.



Fuente: Smith y Read, 1997.

Figura N°1.- Vista microscópica de una micorriza formada entre *Betula alleghaniensis* y *Pisolithus tinctorius*. (a) primer estado de la formación de micorriza, en que una pequeña hifa está presente en la superficie de la raíz y numerosos pelos radicales (flechado) son evidentes. (b) un delgado manto (flechado) ha sido formado en la superficie de la raíz. (c) un compacto manto cubre la raíz y los pelos radicales ya no son evidentes. Bars, 100  $\mu$ m.

El retículo de Hartig está formado por las hifas procedentes del manto que penetran intercelularmente en las primeras capas de células (cortex) de la raicilla. Por lo tanto, en el caso de las ectomicorrizas, el hongo no llega a entrar en el interior de la célula como sucede en las endomicorrizas; sino, tan sólo, entre los tabiques que separan las células (Reyna, 2000).

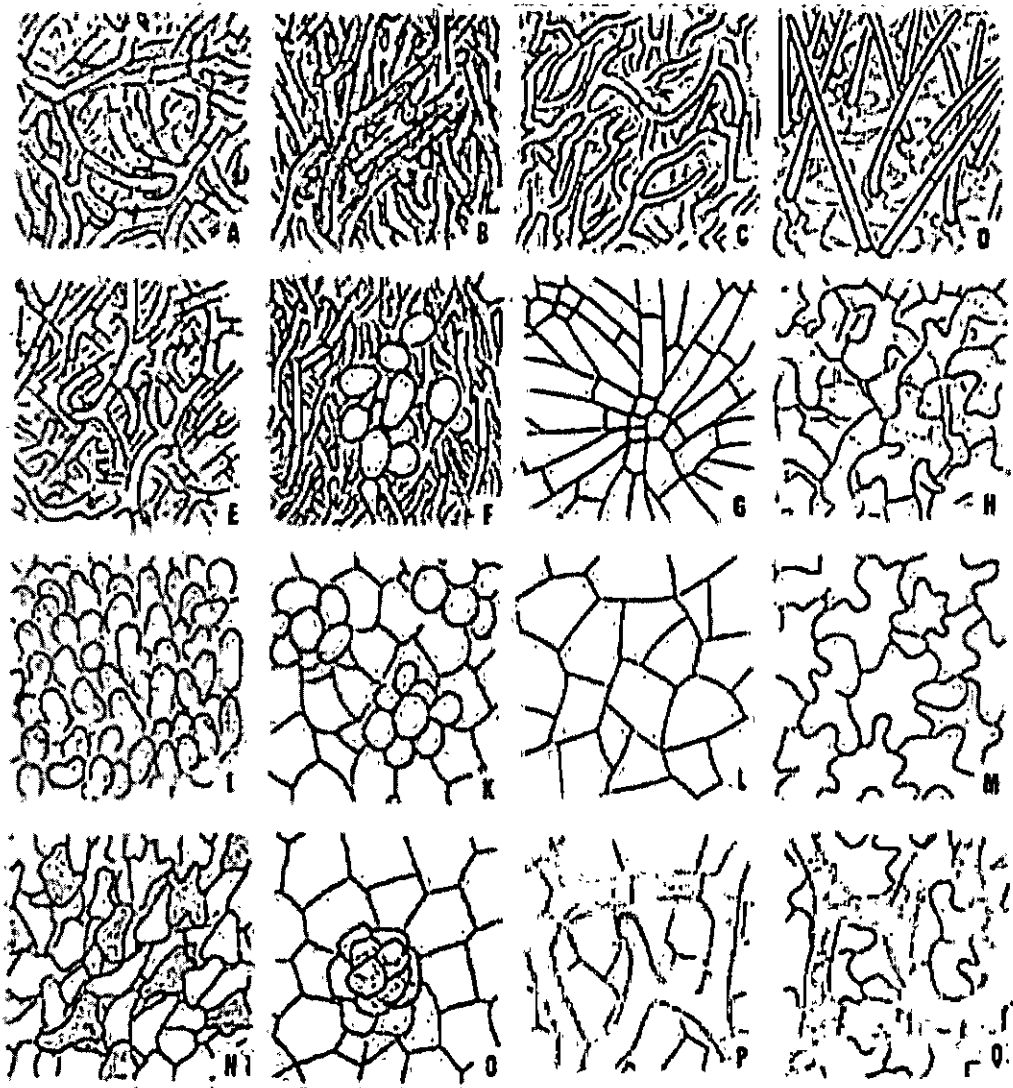
El tejido del manto de las ectomicorrizas mantiene una estructura conveniente para el almacenamiento de nutrientes y, a través de su contacto íntimo con la superficie de la raíz, juega un papel importante en el traslado de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith y Read, 1997).

La naturaleza efímera de los cuerpos fructíferos y el hecho que muchos tipos de micorrizas importantes no son atribuibles a una especie determinada de hongo, hace más fuerte la necesidad de un método de clasificación estable, donde se reconozcan fácilmente las características del manto fúngico y sus estructuras asociadas (Smith y Read, 1997).

El manto fúngico y el micelio asociado determinan varias características morfológicas y anatómicas de las ectomicorrizas y permiten una identificación del micosimbionte en varios niveles taxonómicos. Un catálogo de las características mas importantes y su uso para la identificación del micosimbionte fue establecido por Agerer (1991); esta clasificación requiere un reconocimiento preliminar del color, la morfología de las raíces colonizadas, las características anatómicas del manto y de los elementos miceliares asociados.

La construcción del manto es un rasgo claramente determinado por el hongo y es revelado por una cuidadosa raspadura de la superficie. El manto micorrízico puede ser dividido en dos grupos principales: en el primero, las hifas pueden ser distinguidas como estructuras individuales que forman una libre construcción plectenquimatosa o prosenquimatosa, mientras que en la segunda éstas pierden su identidad como estructuras individuales, formando conglomerados, normalmente con células formadas irregularmente, en diagnóstico, patrones que forman estructuras pseudoparenquimatosas (Smith y Read, 1997).

Agerer (1995) reconoció nueve tipos de mantos plectenquimáticos (A-I) y siete de construcción pseudoparenquimática (K-Q) figura N°2.



Fuente: Agerer, 1991.

Figura N°2.- Dibujos esquemáticos de la superficie de mantos plectenquimáticos (A-I) y mantos pseudoparenquimáticos (K-Q), basados en superficies.

La función de transporte de nutrientes desde el sustrato hasta el manto fúngico es complementada por el micelio extraradical, que consiste de hifas individuales o cordones de hifas paralelas, llamados rizomorfos. Las características estructurales de estos sistemas micelares son de gran importancia, porque sola o colectivamente sus hifas constituyentes forman la conexión entre el manto y el suelo, proporcionando las sendas de intercambio de nutrientes (Smith y Read, 1997).

El nivel más simple de organización se ve en asociaciones formadas por ascomicetes, tal como *Cenococcum geophilum* y *Tuber* spp., y en algunos de los basidiomicetes, es una organización en que las hifas, emanando del manto conservan su individualidad, creciendo como un solo elemento en el suelo (Smith y Read, 1997).

Muchos basidiomicetes asociados a raíces ectomicorrícicas forman agregados de hifas paralelas que dependiente del genero fúngico pueden mostrar un alto grado de diferenciación anatómica. La palabra rizomorfo es la primera usada para describir este tipo de estructura y enfatiza su semejante morfología a la raíz. (Smith y Read, 1997).

### 3.1.2. Beneficios de la asociación ectomicorrícica

El papel de las ectomicorrizas en un sistema forestal es vital y debe contemplarse tanto desde la perspectiva del árbol como de la del hongo (Reyna, 2000); mediante esta asociación, la planta suministra al hongo fuentes de carbono provenientes de la fotosíntesis, como aminoácidos, vitaminas (tiamina), y carbohidratos (sucrosa), que son vitales para su desarrollo y crecimiento (Borie y Rubio, 1986); mientras que los árboles micorrizados obtienen una serie de beneficios para prosperar favorablemente en su ecosistema, de los cuales se pueden mencionar.

- Aumentan la superficie de acción radical, mejorando la capacidad de absorción y asimilación de nutrientes y agua (Ipinza y Grange, 1983). Entre los nutrientes es el fósforo el que más aumenta los niveles de asimilación, citándose incrementos de hasta 10 veces mayor asimilación en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas (Ceruti, 1974; Honrubia, 1992; citados por Reyna, 2000).
- Proporcionan hormonas estimulantes del crecimiento, como auxinas, citoquininas, giberelinas y tiamina B (reguladora de crecimiento), las cuales son producidas por la planta en forma simultánea a las producidas por el hongo, pasando a constituir un aporte extra de tales hormonas. De esta manera, contribuyen a aumentar considerablemente el crecimiento y permiten una mayor longevidad de las raicillas. (Ipinza y Grange, 1986).
- Almacenan en su manto fungoso: P, N, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Na, Si, Zn, Al y B. Además permiten que sustancias minerales insolubles sean utilizadas por la planta (Ipinza y Grange, 1983).

- Mejoran la tolerancia a las situaciones de estrés como las sequías o las enfermedades, otorgando a la planta un mejor sistema de defensa (Borie y Rubio, 1986). Se ha comprobado que las ectomicorrizas bloquean física o químicamente el desarrollo de enfermedades radicales provocadas por hongos patógenos, en bosques naturales, artificiales y en viveros forestales (Ipinza y Grange, 1986).

“Estos beneficios permiten una adaptación de las plántulas a sitios con deficiencias nutritivas, mejorando significativamente su prendimiento, desarrollo y crecimiento” (Ipinza y Grange, 1983).

### 3.2. El género *Tuber* en la sistemática micológica

Las trufas comestibles se clasifican dentro del género *Tuber*, familia *Tuberaceae*, orden *Pezizales*, clase *Ascomycetes*, división *Ascomycota*, reino *Fungi*, de acuerdo con la 9ª edición del Dictionary of the Fungi (Kirk et al., 2001).

Dentro de la familia *Tuberaceae*, el género *Tuber* constituye el grupo fundamental y de mayor importancia dadas sus connotaciones económicas, pero también ha dado lugar a numerosas sinonimias y confusiones en los nombres científicos de las especies que comprende (Reyna, 1999).

Hasta la fecha en Europa se han encontrado treinta especies del género *Tuber*. Solamente unas pocas son comestiblemente apreciadas. Las de mayor valor comercial son las tres siguientes (Sáez y de Miguel, 1995), presentándose las principales características en la tabla N°2.

- *T. melanosporum* es la trufa negra o trufa de Perigod, una de las trufas más apreciadas en España y Francia. Su agradable aroma es muy característico, intenso y persistente, por lo cual es muy apetecida en la comida internacional de alta calidad (Sáez y de Miguel, 1995).
- *Tuber brumale*, conocida comúnmente como trufa machenca, es una trufa negra muy similar a la anterior pero de inferior calidad y precio. Se recolecta junto a *T. nigrum* en los bosques españoles (Reyna, 2000).
- *Tuber aestivum* es la trufa de verano. Tiene menor valor comercial que la trufa negra. Es la que con mayor frecuencia se ve en el comercio español. Su olor es menos intenso y su sabor no parece ser tan apreciado como el de las dos especies anteriores (Reyna, 2000).

Según Reyna (2000) existen otras especies de calidad que también son comestibles y que pueden comercializarse como *Tuber mesentericum* Vittadini, *Tuber albidum* Pico, *Tuber uncinatum* Chatin, etc. No hay que confundir las trufas con otros hongos redondeados subterráneos que no son comestibles o no tienen la calidad de las trufas (*Terfezia*, *Choiromyces*, *Elaphomyces*, etc.).

Tabla N°2.- Características de las principales especies del género *Tuber*.

| Especie             | <i>T. melanosporum</i> Vitt.       | <i>T. brumale</i> Vitt.        | <i>T. aestivum</i> Vitt.    |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Forma ascocarpo     | Subgloboso lobulado                | Subgloboso                     | Subgloboso lobulado         |
| Tipo peridio        | Verrugoso                          | Verrugoso                      | Verrugoso                   |
| Color peridio       | Negro-marrón                       | Negro                          | Negro-marrón                |
| Color gleba         | Marrón, púrpura, negro             | Gris, negro, púrpura           | Marrón claro, avellana      |
| Venas               | Finas y numerosas                  | Anchas y escasas               | Finas y abundantes          |
| Nº esporas por asca | 1-6                                | 2-5                            | 1-6                         |
| Olor                | Agradable, fuerte, muy persistente | Fuerte, agrio, otras agradable | Agradable, poco persistente |

Fuente: Reyna, 1999.

### 3.2.1. Biología y ecología de *Tuber melanosporum* Vittadini

Reyna (2000) indica que *T. melanosporum* es un hongo micorrícico que crece en simbiosis con diferentes especies de árboles. Se produce en Europa, principalmente en Francia, España e Italia y corresponde a una de las variedades más caras de ese continente, llegando a representar en algunos casos un importante recurso económico. La trufa negra es, por otra parte, uno de los pocos hongos micorrícicos hipogeo que es posible cultivar en forma artificial y actualmente existen cultivos en producción en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. La utilización de plantas inoculadas artificialmente en vivero, que se inició en 1973, ha representado el avance más importante en el desarrollo de su cultivo en Europa.

La trufa es por tanto, un hongo que por su interés gastronómico ha dado lugar a multitud de posibilidades de investigación: de ella partió el estudio de las micorrizas, con sus múltiples líneas actuales, y también en cierto modo, el estudio de los hongos. Todo esto encaminado a desvelar el misterio de su origen, formación y desarrollo, dirigido a lograr su cultivo y producción artificial (Etayo y de Miguel, 1998).

#### 3.2.1.1. Aspectos del cuerpo fructífero

El carpóforo (foto N°1) es de aspecto globoso, áspero e irregular a modo de tubérculo negro y subterráneo, de 3 a 6 cm y un peso variable de 20 a 200 g. Su aspecto y tamaño dependen de la época del año; su peridio es de color negro brillante (Reyna, 1999).

La consistencia de la carne del carpóforo, gleba (foto N°2), es de color variable según la madurez, conservando un matiz violáceo-rojizo dentro de las tonalidades negruzcas que la caracterizan. Está recorrida por numerosas venas



blancas o blanquecinas, finas y nítidas, muy ramificadas, confusamente, dándole un aspecto marmóreo. El grosor, color y forma de las venas constituye un elemento taxonómico decisivo (Reyna, 1999).

Las ascas (foto N°3) son globosas, pedunculadas con dimensiones de 90-140 x 80-120  $\mu$ . En su interior encierran de 1 a 4 esporas, rara vez hasta 6. Las esporas son opacas, marrones ornamentadas, con espínulas cortas rígidas y muy densas, el tamaño oscila 29-35-55 x 22-26-35  $\mu$  (Ceruti, 1960 citado por Reyna, 1999).

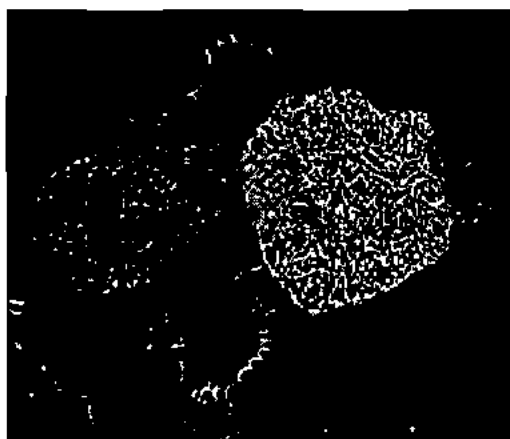


Foto N°1.- Cuerpo fructífero de la trufa negra. S. Reyna



Foto N°2.- Detalle de la gleba de la trufa negra. S. Reyna



Foto N°3.- Esporas de *Tuber melanosporum* en el interior de un asca. S. Reyna

### 3.2.1.2. Aspectos de la micorriza

De acuerdo a las claves elaboradas a partir de los trabajos de Zambonelli *et al.* (1993) y Saez y de Miguel (1995) mencionadas por Reyna (2000); podemos señalar las siguientes características morfológicas.

**Forma** : Se trata de una micorriza simple o con ramificaciones de tipo monopódico, pinnado o piramidal, de ápices redondeados.

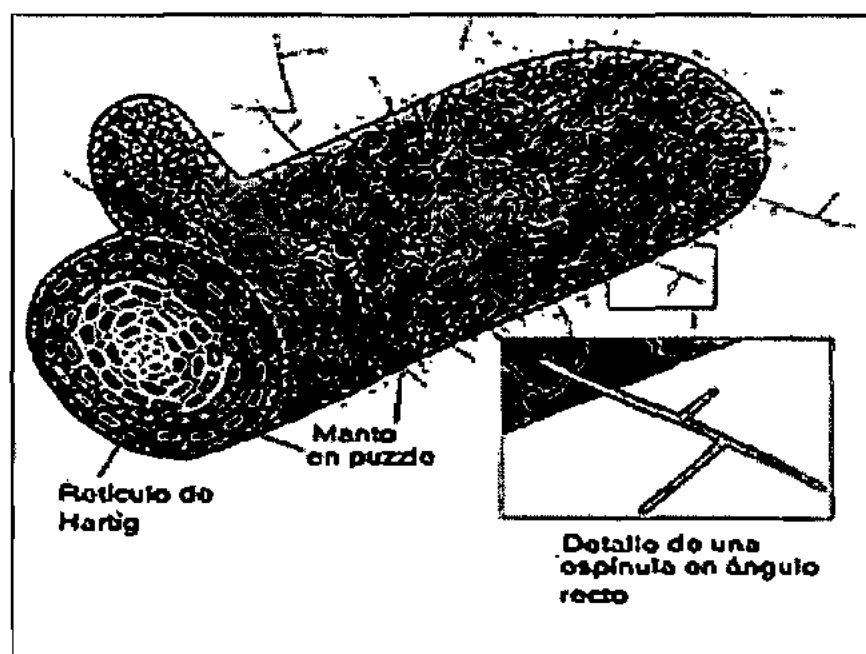
**Color** : El color va del amarillento color miel de las micorrizas jóvenes al castaño oscuro en las mas viejas; los ápices de las micorrizas son ligeramente más claros. Las micorrizas más viejas son color marrón oscuro. Se descartan micorrizas blancas, negras o de colores no comprendidos en la gama indicada.

**Tamaño** : La longitud de la micorriza sin ramificar oscila entre los 1-2 mm y el diámetro entre los 0,2-0,4 mm.

Las características anatómicas son las siguientes:

**Manto** : Presenta una cubierta en patrón Pseudoparenquimático, con pseudocelulas en puzzle (figura N°3).

**Espínulas o cistidios** : De color amarillo claro, tabicadas, rectas, largas de 200 a 300  $\mu$  y hasta 600  $\mu$ , con ramificaciones en ángulo recto (figura N°3), con ápice redondo.



Fuente: Reyna, 2000.

Figura N°3. Diagrama de una micorriza de *Tuber melanosporum*.

### 3.3. Simbiontes naturales de *Tuber melanosporum* Vittadini

El establecimiento de la relación simbiótica entre *T. melanosporum* y su árbol huésped es la primera barrera que debe superarse antes de la implantación de una trufera. Este punto resulta ser clave para el éxito en la producción de trufas, siendo de máxima importancia comprender la asociación entre el hongo y su árbol hospedero (Reyna, 2000). La tabla N°3 menciona las principales especies que forman asociaciones ectomicorrícicas con *T. melanosporum*.

Tabla N°3.- Especies que forman asociaciones ectomicorrícicas con *Tuber melanosporum*.

| Nombre común                                                | Nombre científico        |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Roble pubescente*                                           | <i>Quercus pubescens</i> |
| Roble negro*                                                | <i>Quercus petraea</i>   |
| Encino o roble común*                                       | <i>Quercus robur</i>     |
| Encina*                                                     | <i>Quercus ilex</i>      |
| Coscoja                                                     | <i>Quercus coccifera</i> |
| Avellano europeo*                                           | <i>Corylus avellana</i>  |
| Tilo                                                        | <i>Tilia sp</i>          |
| Carpe blanco                                                | <i>Carpinus sp</i>       |
| Alamos                                                      | <i>Populus sp</i>        |
| Castaño                                                     | <i>Castanea sp</i>       |
| Hayas                                                       | <i>Fagus spp</i>         |
| Carpe*                                                      | <i>Ostrya sp</i>         |
| Cedros                                                      | <i>Cedrus spp</i>        |
| Sauces                                                      | <i>Salix sp</i>          |
| *Especies más adecuadas para producción comercial de trufas |                          |

Fuente: Hall, et al., 2001; Reyna, 2000

Artificialmente se ha logrado la micorrización con otras especies forestales como *Pinus halepensis* (Rodríguez, 1998). En ensayos de carácter limitado se ha logrado la micorrización de *Quercus macrocarpa* con *Tuber melanosporum* en los que se detectaron las primeras micorrizas a los 4 meses de la inoculación con similitud prácticamente total a las de *Corylus* y otros *Quercus* (Reyna, 1999).

### 3.4. La micorrización con *Tuber melanosporum* Vittadini

La micorrización de especies forestales por *Tuber melanosporum* Vitt. es un proceso que se da espontáneamente en la naturaleza, aunque también puede realizarse de modo artificial. La naturaleza, evolución y dinámica del proceso son poco conocidas. Esta situación se ve agravada ante el hecho de que la mayoría de los avances conseguidos en la micorrización con este hongo, no son divulgados y están protegidos por la ley de patentes industriales (Cartié et al., 1996).

### 3.4.1. Técnicas de micorrización

La micorrización artificial es una de las técnicas más promisorias, por los alentadores resultados obtenidos en los últimos años. En la actualidad existen varias técnicas que varían en su grado de elaboración, en sus ventajas y desventajas respecto a la rapidez del efecto, además de los costos asociados a cada una de estas técnicas. A continuación se hace mención a las más importantes:

**Inoculación con suelo Forestal.-** Consiste en agregar al suelo del vivero, o al sustrato que se utilice, una cierta cantidad de tierra extraída de rodales de la misma especie que se desea inocular. Es muy utilizado y sin duda el procedimiento más “natural” (Vergara, 1997 citado por Carrasco, 1998).

**Inoculación con plantas micorrizadas.-** A espacios regulares dentro del vivero se coloca un cierto número de plantas micorrizadas. Se obtiene una micorrización muy lenta comparado con otros métodos, además de ser poco homogénea, se desconoce la identidad del o los hongos micorrizantes y al igual que el método de inoculación con suelo forestal, es posible introducir agentes fitopatógenos en el vivero (Vergara, 1997 citado por Carrasco, 1998).

**Inoculación mediante esporas.-** La inoculación mediante esporas es la técnica más práctica de infección de hongos micorrícicos, su limitación básica radica en la obtención de una cantidad adecuada de esporas, especialmente si se desea realizar micorrizaciones a gran escala (Vergara, 1997 citado por Carrasco, 1998).

**Inóculos vegetativos (cultivos puros).-** De acuerdo al conocimiento actual, el uso de inóculo vegetativo de hongos micorrizantes es el mejor método de inoculación, ya que primero se puede escoger la especie fungosa y segundo eliminar el riesgo de introducir enfermedades. Sin embargo, para el éxito de los cultivos puros se debe conocer qué especie fungosa es la más beneficiosa, cómo cultivar las especies para producir suficiente cantidad de inóculo y cómo realizar la inoculación en viveros o en condiciones de campo.

### 3.4.2. Métodos de inoculación con *Tuber melanosporum* Vittadini

El método para inocular se basa en facilitar el contacto entre el hongo, la trufa y las raíces de la planta, y a la vez evitar al máximo cualquier tipo de competencia de otros hongos (Reyna, 2000).

De acuerdo a Cartié *et al.*, (1999) existen variadas modalidades de inoculación con *T. melanosporum*, y se desarrollan de acuerdo a la experiencia y técnica de cada truficultor, intentando una mayor seguridad y eficacia en la micorrización. A pesar de aquello existen dos métodos que son los mas empleados en Europa para producir plantas micorrizadas con *Tuber*, inoculación en seco e inmersión de raíces en inóculo líquido.

La inoculación en seco permite ajustar la dosis al valor deseado de un modo exacto, utilizándose generalmente dosis de inóculo desde 0,5 hasta 2 g/planta, este inóculo se logra mezclando trufa en polvo con talco inerte, para conseguir una mejor distribución. En este procedimiento se dispersa el inóculo uniformemente sobre las raíces de las plantas con un salero de luz muy fina, especialmente preparado para ello (Cartié *et al.*, 1999; Reyna, 2000).

Por otra parte, la inmersión de raíces es otro método comúnmente utilizado para micorrizar las plantas, el cual utiliza un aditivo líquido como alginatos o algunos activadores de la germinación para espesar la suspensión y hacerla más adherente, en este caso se sumerge el sistema radical en la suspensión esporífera. Para este procedimiento es fundamental utilizar trufa bien madura, incluso casi podrida, siendo necesario entre 1 a 3 g de trufa por planta (Cartié *et al.*, 1999; Reyna, 2000).

Cartié *et al.*, (1996) en el ensayo de un nuevo método de inoculación de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt, comprobó la eficacia de distintos coadyuvantes en el proceso de inoculación, obteniendo los mejores resultados con talco, ya que resultó ser menos fitotóxico para las plantas que los geles y también el más efectivo en cuanto a la producción de ápices micorrizados.

### 3.4.3. Control cuantitativo de las micorrizas

Para analizar el grado de micorrización, existen dos métodos de evaluación; el muestreo porcentual y el muestreo volumétrico.

Los sistemas de control del grado de micorrización más frecuentes aplicados obtienen datos porcentuales como los propuestos por Fischer y Colinas (1997), es decir de una planta o un lote de plantas se comprueba que tiene un determinado porcentaje de ápices radicales micorrizados con la especie. Evidentemente con este método se desconoce cuantos ápices tiene la planta y la cantidad de inóculo que estamos adquiriendo.

El sistema de muestreo en volumen, por su parte, permite obtener datos medios del número de micorrizas por planta, lo que en definitiva es el producto activo de una planta micorrizada, por lo tanto permite evaluar además la efectividad de la inoculación. Ese sistema tiene un gran interés ya que da resultados en función del volumen y no como porcentaje, lo cual permitirá comparar sistemas radicales entre sí.

De acuerdo a Reyna *et al.*, (2000), en el estudio sobre control de calidad en la planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. producida por viveros comerciales; mediante ambos sistemas, volumétrico y porcentual, se obtienen datos de porcentaje de micorrización similares. En los datos relativos a contaminaciones con otras micorrizas, la aproximación entre los dos métodos es menor, sin embargo el volumétrico detecta mayores porcentajes de micorrización contaminante, por lo que se considera más adecuado. Por otra parte, el sistema volumétrico, es un ensayo no destructivo que permite realizar un seguimiento posterior de las mismas plantas.

Distintos autores consideran (Bencivenga *et al.*, 1995, Fischer y Colinas, 1997; Palazón *et al.*, 1999) que a partir de un 25% de micorrización, según unos, y hasta un 33% de micorrización según otros, la planta ya es de calidad. Además el grado de contaminación con otras micorrizas admisible no debe superar el 25% sobre el número de ápices con *T. melanosporum* (Fischer y Colinas, 1997).

#### **3.4.4. Factores ecológicos relacionados a la micorrización**

Según Hemard *et al.*, 2000, la infección micorrícica depende de condiciones que determinan las características de los fitosimbiontes y del suelo, en particular, Entre estos factores condicionantes se pueden mencionar que:

- Al aumentar la intensidad luminosa, el aumento de micorrizas es proporcional al número de raíces cortas, posiblemente por un aumento en la disponibilidad de nutrientes, principalmente carbohidratos libres en las raíces.
- La temperatura tiene una acción directa sobre el porcentaje de crecimiento radical y sobre la producción de nuevas raíces. Las temperaturas óptimas para el crecimiento varía entre 17 y 27 °C para la mayoría de los hongos, como por ejemplo *Lactarius*, *Amanitas*, y algunos *Boletus*, que tienen un óptimo térmico superior a los 20 °C.
- Las formaciones micorrícicas están influenciadas por la humedad del suelo y por la aireación. Se presume que el crecimiento miceliar decrece con una baja concentración de oxígeno, debido a que la mayoría de estos hongos micorrícicos son aeróbicos.
- La presencia de raíces asociadas a micorrizas se detecta especialmente en el horizonte húmico. La cantidad y la calidad de humus, constituye el factor más importante en la formación de las micorrizas, por lo tanto estas disminuyen con la profundidad.
- Al existir deficiencias de N, P y K disponibles, se impide la formación micorrícica y el crecimiento radical, pero al existir una deficiencia moderada de uno de estos nutrientes la infección se lleva a cabo.

#### **3.5. Principios y condiciones del cultivo**

En los datos referentes a las exigencias de la trufa, respecto a las condiciones de cultivo, se encuentra un importante número de concordancias entre los diferentes autores. A partir de esta información se realizan recomendaciones de tipo orientativo, para los parámetros geográficos, climáticos y edáficos.

### 3.5.1. Condiciones geográficas

El rango de altitudes en que la trufa se presenta en los diferentes países europeos alcanza su mínima altura en 100 m en Francia e Italia y el máximo sobre los 1.500 m en España. Aunque no es corriente que la trufa se produzca por debajo de los 700 m. La altitud promedio está comprendida de los 700 a 1.400 m sobre el nivel del mar (Reyna, 2000).

La orientación general de las truferas es hacia exposiciones Oeste y Sur, nunca Norte (Saéz y de Miguel, 1995).

Las truferas se sitúan normalmente en pendientes moderadas y cada vez con más frecuencia en pendientes suaves, hasta 60% como máximo, aunque las más comunes son del orden del 15% (Sáez y de Miguel, 1995).

### 3.5.2. Condiciones climáticas

El clima general de las zonas truferas es predominantemente continental, presentando inviernos fríos y veranos calurosos. El régimen de precipitaciones de estas áreas es el típico mediterráneo con sequía estival y máximo de precipitaciones en otoño. El rango ideal de pluviometría para la trufa sería de 600-900 mm/año.

En cuanto a temperatura, Saez y de Miguel, (1995); Reyna, (2000), indican varios valores que guardan relación con el área geográfica donde es posible el desarrollo de la trufa, presentados en la tabla N°4.

Tabla N°4.- Rangos de temperaturas óptimas propuestos para la trufa.

| TEMPERATURAS(°C)                      | RANGO    |
|---------------------------------------|----------|
| Temperatura media anual               | 11 - 14  |
| Temperatura máxima del mes más cálido | 23 - 32  |
| Temperatura media del mes más cálido  | <20 - 22 |
| Temperatura mínima del mes más frío   | -2 - -6  |
| Temperatura media del mes más frío    | >2       |
| Temperatura máxima absoluta           | 35 - 42  |
| Temperatura mínima absoluta           | -9 - -25 |

### 3.5.3. Condiciones edáficas

La trufa se desarrolla sobre suelos calcáreos de 10-40 cm de profundidad del tipo rendzina, calcosoles y calcisoles. La principal característica de estos suelos es su alto pH, lo cual es causado por un alto contenido de carbonato de calcio (piedra caliza). Idealmente, el pH del suelo debe ser mayor que pH 7,5, con un óptimo de pH 7,9 (Reyna, 2000; Saez y de Miguel, 1995).

La profundidad del suelo es un parámetro importante, del cual depende la capacidad para retener agua y ponerla a disposición de la vegetación y consecuentemente de la trufa. También la profundidad del suelo determinará en algunos casos la especie simbiote a utilizar (Reyna, 2000).

La presencia de carbonato cálcico es un requerimiento indispensable para la presencia de *T. melanosporum*. Absolutamente todos los autores citan su existencia a lo menos en la roca madre o en los materiales gruesos del suelo (Reyna, 1999)

La textura del suelo, es junto con la caliza y la materia orgánica, uno de los factores que determinan la naturaleza de la estructura y, por lo tanto, los caracteres de aireación e hidrodinamismo del suelo. La textura por tanto deberá ser equilibrada. Deben desecharse los suelos muy arcillosos por su compactación excesiva, los suelos limosos, limo-arcillosos o limo-arenosos, por su carácter muy desfavorable al apelmazamiento; y los suelos excesivamente arenosos, por su poca capacidad de retención de agua.

La mejor estructura es la que asegura el máximo de aireación y, al mismo tiempo, la mayor facilidad para la penetración de las raíces del árbol y el micelio de la trufa. Esta descripción corresponde a la llamada estructura granulosa o grumosa, resultado de un equilibrio entre arena, limo y arcilla (Hall, *et al.*, 2000; Reyna, 2000). En la tabla N°5 se entregan los principales rangos recomendados por distintos autores para los parámetros de las condiciones edáficas requeridas por *T. melanosporum*.



Tabla N°5.- Características de los terrenos recomendados para el cultivo de trufa negra.

| PARÁMETRO                               | RANGO                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7,5 - 8,5 (Palazón <i>et al.</i>, 2000)</li> <li>• 7 - 8,5 (Sáez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 7,45 - 8,23 (Reyna, 1999)</li> <li>• En general el óptimo es 7,9</li> </ul> |
| Materia orgánica oxidable (%)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 - 10 (Palazón <i>et al.</i>, 2000)</li> <li>• 1,5 - 8 (Sáez y de Miguel, 1995)</li> <li>• Óptimo estaría próximo a 3</li> </ul>                                          |
| Calcio intercambiable (% óxido cálcico) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;0,5 (Sáez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 0,4 - 1,6 (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                   |
| Caliza total (%)                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• mínimo de 10% (Sáez y de Miguel, 1995)</li> <li>• 0 - 83% (Reyna, 1999)</li> </ul>                                                                                         |
| Nitrógeno (Kjeldahl) (%)                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 - 0,3 (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                                                                                               |
| Fósforo                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fósforo total (%) 0,1-0,3</li> <li>• Fósforo asimilable (Olsen) (ppm) 12 -18 (Bonet y Colinas, 1999)</li> </ul>                                                            |
| Potasio (% óxido potásico)              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,01 - 0,03 (Bonet y Colinas, 1999a)</li> </ul>                                                                                                                            |
| Magnesio intercambiable (%)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,01 - 0,03 (Sáez y de Miguel, 1995).</li> </ul>                                                                                                                           |
| Textura                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• No muy arcillosos ni excesivamente arenosos, limosos, limo-arcillosos o limo-arenosos</li> </ul>                                                                           |
| Estructura                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Granulosa o grumosa</li> </ul>                                                                                                                                             |
| Ratio C/N                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8 - 15 con óptimo 10-11 (Bonet y Colinas, 1999).</li> </ul>                                                                                                                |

Fuente: Bonet J. y Colinas C. 2000

### 3.6. Ciclo biológico de la trufa

De acuerdo a Reyna (2000), el ciclo biológico de la trufa en Europa, representado en la figura N°4, es el siguiente:

La trufa una vez plenamente madura (mediados del invierno hasta principios de la primavera), debe liberar las esporas que encierra. Cuando se alcanza la temperatura y humedad adecuada, temporada de primavera, la espora comienza a germinar emitiendo un finísimo filamento de micelio que se ramifica rápidamente.

El filamento micelial emitido por la espora se introduce y explora el suelo en busca de raicillas que debe encontrar en poco tiempo o de lo contrario, en cuanto termine la reserva de nutrientes de la espora, morirá. En contacto la raicilla de una especie adecuada y el filamento micelial, comienza a formarse una micorriza, a esta primera infección se la suele denominar infección primaria. El micelio se desarrolla penetrando en el interior para formar el retículo Hartig y

formando externamente el manto del que parten de nuevo hifas para propagar la infección hacia las raicillas próximas.

A partir de las micorrizas primarias el micelio comienza a colonizar el suelo, encontrando en su desarrollo nuevas raicillas y formando micorrizas secundarias; todo el proceso de infección se extiende por el suelo y el sistema radical, hasta que alcanza una cierta cantidad crítica de biomasa de micorrizas a partir de la cual, si las condiciones ecológicas son adecuadas, ya puede producirse la fructificación.

En los meses de primavera, parte de los filamentos miceliares empiezan a especializarse, agrupándose y compactándose hasta dar lugar a la formación de un pequeño núcleo o primordio de la futura trufa.

De acuerdo con Barry (1992) a finales de la primavera o principios del verano se da comienzo a una fase saprofítica en la trufa, el carpóforo se independiza de las micorrizas y vive a partir de las sustancias orgánicas del suelo. En esta fase se produce un engrosamiento considerable de la trufa y es necesario una cierta cantidad de lluvia para que los carpóforos lleguen a buen fin. A final del verano comienzan a diferenciarse las esporas y con la maduración se produce la emisión de aromas, que son máximos cuando la trufa está plenamente madura y sus esporas son viables para germinar.

La progresiva emisión de olores debida a la maduración atraerá a todo tipo de animales e insectos para cerrar el ciclo iniciándose de nuevo el proceso de dispersión de las esporas. El ciclo de formación de las trufas dura, por tanto, del orden de 8 meses desde que comienzan a formarse los primordios iniciales hasta que madura plenamente.



Fuente: Reyna, 2000.

Figura N°4.- Esquema del ciclo biológico de la trufa, en Europa.

### 3.7. Especies simbiotes potenciales en Chile

El desarrollo de micorrizas es también una adaptación al suelo de muchas especies forestales. Es sabido que especies que se desarrollan en suelos fértiles y húmedos o mésicos, logran sobrevivir en suelos pobres en nutrientes, especialmente en nitrógeno, y relativamente secos, gracias a la simbiosis de sus raíces con hongos micorrícicos. Esta característica es típica de especies de *Nothofagus*, particularmente aquellas de amplia distribución en medio ambientes muy variados en cuanto a suelo, como *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus obliqua* (Singer y Moser, 1965; Donoso, 1981; citados por Donoso, 1993).

De acuerdo a Carrillo *et al.* (1992) en el estudio de la simbiosis micorrícica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile, el tipo ectomicorrícico y ericoide se ubica en el segundo lugar, luego de un claro dominio del tipo vesículo arbuscular (VA), en las comunidades estudiadas. Sin embargo, la simbiosis ectomicorrícica se encuentra únicamente en las especies de *Nothofagus*, siendo el bosque de *N. obliqua* el que presenta la mayor riqueza de especies micorrícicas.

La especificidad que se presenta entre las especies arbóreas y cierta clase de hongos es esencial para que se realice una asociación simbiótica, sin embargo existen otros factores que inciden en los resultados de esta simbiosis, y hacen mención principalmente a las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrollan ambos. La tabla N°6 menciona las principales especies presentes en Chile factibles de formar asociaciones ectomicorrícicas con *T. melanosporum*.

Tabla N°6.- Especies presentes en la zona centro sur de Chile, factibles de formar asociaciones ectomicorrícicas.

| Nombre común       | Nombre científico        |
|--------------------|--------------------------|
| Encino             | <i>Quercus sp.</i>       |
| Avellano europeo   | <i>Corylus avellana.</i> |
| Tilo               | <i>Tilia sp.</i>         |
| Alamo              | <i>Populus sp.</i>       |
| Castaño            | <i>Castanea sp.</i>      |
| Eucalipto          | <i>Eucalyptus sp.</i>    |
| Pino               | <i>Pinus sp.</i>         |
| Sauce              | <i>Salix sp.</i>         |
| Roble*             | <i>Nothofagus sp.</i>    |
| * Especies nativas |                          |

Fuente: Proyecto FIA CO1-1-A-085

### 3.7.1. *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser

Especie endémica y característica de la zona mesomórfica de Chile. El área de distribución natural de *N. glauca* (hualo), comprende las altitudes medias de la Cordillera de los Andes y de la Cordillera de la Costa en la zona central de Chile (Santelices, 1997).

El área de distribución natural tiene un clima mediterráneo muy característico. La distribución de las precipitaciones se concentra en el invierno y el periodo estival es muy seco, llegando a tener hasta 5 meses sin precipitaciones (Santelices, 1997).

Se desarrolla en altitudes que van desde los 400 hasta los 1.100 m.s.n.m. El régimen térmico se caracteriza por temperaturas mínimas que fluctúan entre los -3,2 a 9,4 °C y temperaturas máximas entre los 16,5 a 31,3 °C. Las precipitaciones oscilan entre los 323,8 y 1.025 mm anuales (CONAF, 1998).

Los suelos de la distribución costera son en su mayoría de origen granítico y metamórfico y los de la andina, volcánicos. En las dos regiones no se presentan grandes diferencias en la acidez y el pH varía entre 5 y 5,8 (Córdova y Pérez, 1996 citados por Santelices, 1997). Se desarrolla bien en suelos pedregosos y delgados, con pendientes pronunciadas y rocosas. Sus principales limitantes parecen ser las bajas temperaturas y los suelos extremadamente húmedos (Conaf, 1998).

### 3.7.2. *Nothofagus obliqua* var *obliqua* (Mirb) Oerst.

Esta especie, comúnmente conocida como roble, se presenta en una amplia variedad de suelos, preferentemente en suelos profundos, fértiles y con cierta humedad, teniendo un característico manto de materia orgánica en descomposición (Donoso, 1979 citado por INFOR-CONAF, 1998).

El pH varía desde ácidos a neutros, preferentemente se encuentra en suelos fértiles, profundos y con cierta cantidad materia orgánica en descomposición (Pimstein, 1974; Donoso, 1981 citado por INFOR-CONAF, 1998).

El clima para esta especie es templado-frío lluvioso al sur de su distribución; hacia el Norte experimenta la influencia mediterránea. Se desarrolla en pendientes medias de 20% entre los 200 y 700 m.s.n.m. Las temperaturas medias anuales varían entre 10-14 °C (Donoso, 1979 citado por INFOR-CONAF, 1998).

### 3.7.3. *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf) Samp.

La encina, nombre común de *Q. ilex*, se adapta prácticamente a todo tipo de suelos, principalmente silíceos, calizos y yesosos, requiriendo mayor profundidad a medida que disminuyen las precipitaciones (Reyna, 2000). En suelos arcillosos o barros pesados apenas fructifica, debido al alto contenido de coloides que impiden la penetración del aire necesario para el desarrollo y normal extensión de las raíces (Fuentes, 1994).

La encina es un árbol que trabaja de forma neutral, descalcificando los suelos calizos y enriqueciendo los suelos ácidos (Montoya, 1993). El vigor y desarrollo aéreo de esta especie, dependen de la buena textura y profundidad del suelo en el que se desarrolla su sistema radical (Fuentes, 1994).

Las zonas donde se asientan las encinas son de diversa ecología, con una precipitación anual media de 500-600 mm pudiendo darse límites muy variados que van desde los 300 mm a 2.500 mm, una altitud de 0-2.200 m y temperaturas medias de entre -3° a 28 °C (Ruíz de la Torre, 1976 citado por Reyna, 2000).

Es la especie trufera por excelencia, muy estimada como productora de trufa de calidad. De crecimiento lento, tarda muchos años en entrar en producción (Sáez y de Miguel, 1995).

### 3.7.4. *Quercus robur* L.

*Q. robur* o encino como se le denomina comúnmente, es una especie típica de regímenes climáticos oceánicos (Reyna, 1999), se desarrolla bien en climas templado frío, tiene una gran resistencia al frío e incluso heladas tardías de cierta intensidad.

Se desarrolla sobre sustratos tanto silíceos como calizos, precisa suelos de buena fertilidad y humedad, tolerando además suelos más pesados y arcillosos, incluso con un cierto encharcamiento estacional. Esta especie requiere desarrollarse a plena luz.

Su rango latitudinal va desde 0 a 1.000 m, incluso puede llegar a los 3.000 m. Requiere precipitaciones superiores a 600 mm anuales de los que al menos 200 mm deben corresponder a precipitaciones estivales, importante es la humedad ambiental, el régimen de temperaturas esta comprendida entre -15 y 10 °C en invierno y entre 10 y 25 °C en verano. Resiste temperaturas extremas de -22 ° a 44 °C (Ruíz de la Torre, 1990 citado por Reyna, 1999).

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se dividió en dos ensayos: el ensayo I, realizado en invernadero, estudió la micorrización obtenida en las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus glauca* y *Nothofagus obliqua* inoculadas con *Tuber melanosporum*, este ensayo fue representado por una población de 54 plantas/especie, bajo condiciones de cultivo controladas. El ensayo II, al aire libre, evaluó la micorrización de las especies nativas *N. glauca* y *N. obliqua* inoculadas con *T. melanosporum* bajo dos niveles de pH y también el efecto competitivo de las micorrizas nativas, para ello consideró 4 tratamientos, descritos en la tabla N°9, representados por 54 plantas/tratamiento.

### 4.1. Materiales

Los ensayos I y II se realizaron en el vivero de la Universidad Católica del Maule, ubicado en la comuna de Talca, Séptima Región. Geográficamente se localiza a 35° 26' 10" latitud sur y 71° 37' 05" longitud oeste, y según clasificación climática de Köppen, el área se ubica en una zona de clima templado cálido con lluvia suficiente y estación seca en verano.

#### ENSAYO I

El invernadero de estructura de acero galvanizado con cubierta de polietileno de alta densidad de cuatro temporadas, con una superficie de 126 m<sup>2</sup> aproximadamente, se sombreó en su totalidad con malla raschell de 65% de cobertura, su equipamiento reguló las variables temperatura y humedad, mediante un sistema de calefacción y cooling automatizados, dependiendo de las condiciones meteorológicas y las etapas de desarrollo de las plantas simbiotes y el hongo.

Para evitar posibles contaminantes, el invernadero se implementó con ventanas protegidas por mallas antiáfidos, el piso se cubrió con malla antimaleza, los mesones se levantaron del piso a una altura de 80 cm y la entrada contó con una antecámara de desinfección.

El material vegetal corresponde a plantas de 6 meses de cultivo en sustrato inerte, en invernadero, de las especies *Q. ilex*, *Q. robur*, *N. glauca* y *N. obliqua*; obtenidas a partir de semillas<sup>1</sup> previamente desinfectadas con hipoclorito sódico al 10% por 20 minutos.

El sustrato de siembra y el tratamiento pregerminativo varió según el género: a las semillas de las especies de *Quercus* se le aplicó un remojo en agua fría durante 24 horas y el sustrato fue una mezcla de vermiculita/perlita en una proporción 1:1; mientras que a las semillas del género *Nothofagus* se les aplicó un remojo de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en una concentración de 100 ppm durante 24 horas, sembradas en una mezcla de corteza compostada/vermiculita/perlita, en

<sup>1</sup> Las semillas de *Nothofagus* procedentes de Linares fueron obsequiadas por el Centro Semillero de Chillán, mientras que las semillas de *Q. ilex* fueron procedían de Santiago y las de *Q. robur* de la comuna de Talca.

una proporción 3:1:1; la corteza compostada fue previamente desinfectada antes de ser aplicada a la mezcla.

Se utilizó bandejas de cultivo con una cama de siembra de 18 cm de altura. Es fundamental resguardar las condiciones de asepsia durante toda la etapa de cultivo, sustentado en la producción de una planta con un sistema radical limpio y libre de contaminantes.

El material fúngico inoculado corresponde a la especie *Tuber melanosporum* Vittadini.<sup>2</sup>, aplicado como una mezcla constituida por trufa molida y talco inerte ( $3\text{MgO}_4\text{SiO}_2\text{H}_2\text{O}$ , Hidrosilicato de Magnesio) en una relación 1:4, preparada por el Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM, España), e importada desde España atendiendo a factores de prevención y seguridad sanitaria.

El sustrato<sup>3</sup> de transplante utilizado es una mezcla de tierra calcárea, vermiculita, perlita y turba rubia, esterilizada a vapor durante 90 minutos a temperatura sobre los 100 °C, encalada para obtener un pH 8,1, con una doble aplicación de carbonato de calcio, granulometría fina (polvo) y granulometría gruesa (> 1mm).

Los contenedores de tipo libro utilizados en el transplante, tienen una capacidad de 450 cc de tipo autopoda y con estrías para evitar el espiralamiento de la raíz.

## ENSAYO II

A diferencia del ensayo I, el aislamiento de agentes contaminantes para este ensayo fue mínimo y se resume en la protección, del espacio al aire libre, con malla raschell de 65% de cobertura, instalada por los contornos y a una altura de 5,40 m del suelo y en el levantamiento de los mesones a una altura del suelo de 80 cm, por lo que las plantas crecieron con la constante amenaza de propágulos de hongos competitivos presentes en el ambiente y de manera principal en el sustrato utilizado.

El material vegetal corresponde a plantas de 6 meses de cultivo estéril, en invernadero, de las especies *N. glauca* y *N. obliqua*, obtenidas a partir de semillas previamente desinfectadas con hipoclorito sódico al 10% por 20 minutos. El sustrato de siembra y el tratamiento pregerminativo, fue el utilizado en el ensayo I, para las especies del género *Nothofagus*, utilizando bandejas de cultivo con una cama de siembra de 18 cm de altura.

El material fúngico inoculado fue el mismo utilizado para ambos ensayos y se describe en el ensayo I.

<sup>2</sup> Los carpóforos de esta especie utilizados en la mezcla fueron recolectados en una plantación de *Quercus ilex* ssp. Ballota de la provincia de Castellón, España

<sup>3</sup> El sustrato de transplante utilizado en el ensayo I, corresponde al propuesto por el Proyecto "Truficultura", desarrollado por la Universidad Católica del Maule, junto con FIA y CEAM

En el sustrato de transplante se utilizó sustrato de bosque de *Nothofagus*<sup>4</sup> extraído de los primeros 10 cm de suelo, tamizada y homogenizada. Para el sustrato I se conservó el pH 6,5, pH natural del sustrato de bosque; para el sustrato II se realizó una doble aplicación de carbonato de calcio, granulometría fina (polvo) y granulometría gruesa (> 1mm), elevando el pH a 7,7; ambos sustratos se utilizaron sin esterilizar.

Los contenedores de tipo libro utilizados en el transplante, tienen una capacidad de 450 cc de tipo autopoda y con estrías para evitar el espiralamiento de la raíz.

Se realizó un análisis de suelo a ambos sustratos, presentados en la tabla N°7, donde la letra E identifica el ensayo al que corresponde y la letra S define sustrato, para el caso del ensayo II.

Tabla N°7. - Análisis de suelo de los sustratos.<sup>5</sup>

| Sustratos  | Condiciones de asepsia | pH aprox. | M.O. % | N %  | P %  | K %  | C/N  | CaCO <sub>3</sub> % |
|------------|------------------------|-----------|--------|------|------|------|------|---------------------|
| E-I        | esterilizado           | 8,4       | 4,2    | 0,10 | 0,14 | 0,51 | 24,6 | 10                  |
| E-II ; S-1 | sin esterilizar        | 6,5       | 28,5   | 0,77 | 0,23 | 4,72 | 21,4 | 6,1                 |
| E-II ; S-2 | sin esterilizar        | 7,7       | 25,6   | 0,64 | 0,25 | 3,74 | 23,3 | 15,5                |

## 4.2. Metodología

Las etapas inoculación y análisis micorrízico se realizaron de acuerdo a metodologías propuestas por Reyna, (2000), utilizando los mismos procedimientos para ambos ensayos.

### 4.2.1. Inoculación y transplante

La inoculación de las plantas cultivadas se realizó en el mes de noviembre del año 2002, en las condiciones de asepsia presentadas por el invernadero y aproximadamente a las 18:00 horas, para asegurar un ambiente donde la temperatura no supere los 20 °C.

Las plantas se sacaron del sustrato de siembra protegiendo las raicillas finas y mantenidas en depósitos con agua fresca, con ello se eliminó gran parte del sustrato adherido y se hidrataron las raíces hasta el momento de ser inoculadas; el intervalo de tiempo que transcurrió entre el arranque de la planta, la inoculación y posterior transplante no superó los 15 minutos. Se debe procurar que la raíz sufra el mínimo de estrés para este procedimiento.

<sup>4</sup> El bosque es del tipo forestal roble-hualo, ubicado en el Fundo Cordillera, sector el Colorado, comuna de San Clemente; propiedad de la Universidad Católica del Maule.

<sup>5</sup> Los análisis de suelo fueron realizados por el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Talca.



En un mesón de trabajo, previamente desinfectado, se dispersaron 11 litros de sustrato de transplante, sobre el cual se ubicó el sistema radical de 24 plantas (foto N°4), sustrato y especie correspondiente al mismo tratamiento; luego con un salero de luz mediana que contenía 12 g de inóculo y mediante la técnica de inoculación en seco se espolvoreó homogéneamente 0,5 g de inóculo,<sup>6</sup> por sistema radical (foto N°5).

Las raíces de la planta son el principal receptor de la mezcla, pero parte de la dosis que no se adhirió, se incorporó en la cama de sustrato en las que fueron colocadas, sustrato que se utilizó para el transplante a los contenedores, de las plantas inoculadas.



Foto N° 4.- Plantas de hualo, previo a la inoculación

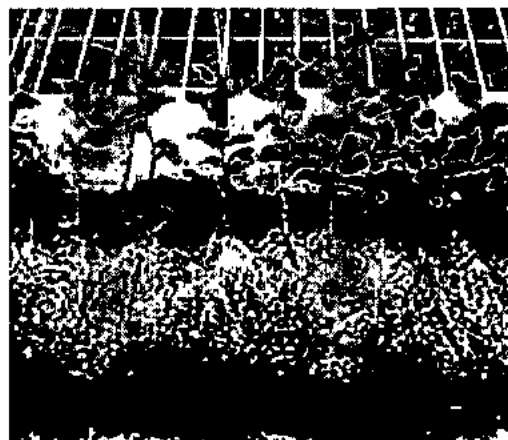


Foto N° 5.- Plantas de hualo inoculadas

El riego de ambos ensayos fue a través de un sistema de microaspersión, con agua clorada reposada por 48 horas en un estanque; según requerimiento hídrico de la planta mediante observaciones diarias, regulado por un programa de riego cada 2 días.

#### 4.2.2. Niveles de Micorrización

A los 6 meses de realizada la inoculación se comenzó con la evaluación de los niveles de micorrización, la que consistió en un análisis cualitativo y cuantitativo a una muestra al azar de 18 plantas por especie para el ensayo I y de 6 plantas por bloque para el ensayo II.

<sup>6</sup> La dosis de inóculo aplicada se determinó a través de un análisis de campo realizado con el experto Santiago Reyna al inicio de la inoculación, optimizando la capacidad de fijación del sistema radical

Para el análisis se utilizó el muestreo volumétrico<sup>7</sup> a una muestra de 7 cc, extraída del cepellón de la planta; para ello se trasladó la planta a un contenedor perforado, en su parte media<sup>8</sup> (foto N°6), con las mismas dimensiones del sacabocado utilizado (foto N°7), el cual se introdujo en sentido horizontal imprimiendo una rotación constante para procurar el corte de las raíces y evitar su desgajamiento o rotura. Extraída la muestra (foto N°8), el orificio fue rellenado y la planta devuelta a su contenedor original.

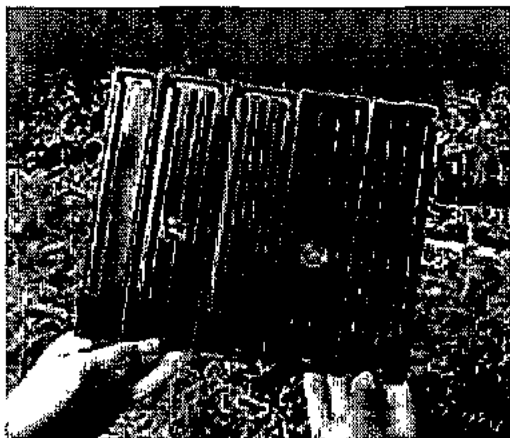


Foto N° 6.- Contenedor



Foto N° 7.- Sacabocado

La muestra extraída (foto N°9) se preparó en laboratorio; realizando varias decantaciones sucesivas, eliminando gran parte de las partículas de sustrato adheridas a las raicillas. El producto se recogió sobre un tamiz de 1 mm y se depositó en una placa Petri con agua destilada. Si aún existía sustrato adherido, se retiró cuidadosamente con un pincel fino, para evitar la pérdida de ápices radicales.

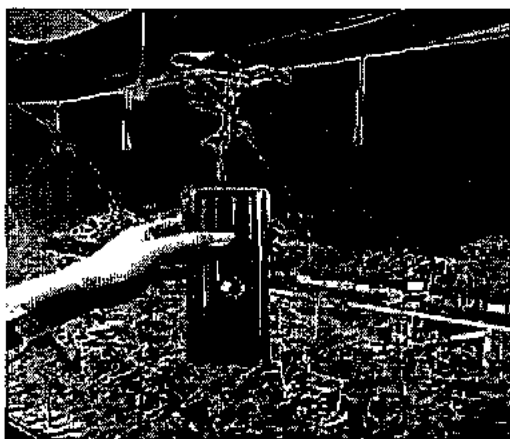


Foto N° 8.- Toma de muestra

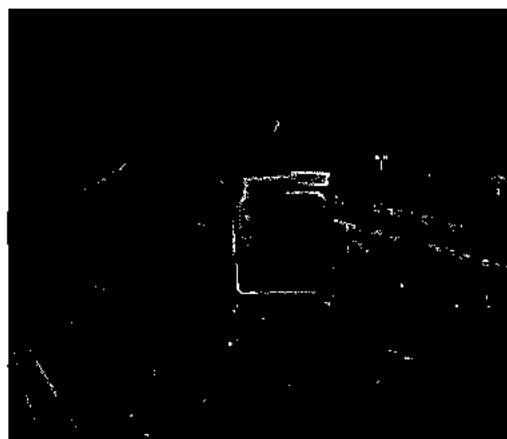


Foto N° 9.- Muestra extraída

<sup>7</sup> Reyna, S (1997) sistema de muestreo propuesto por el experto Santiago Reyna que permite ofrecer datos medios del N° de micorrizas por planta, además de permitir realizar un seguimiento posterior a la misma planta, por no ser un método destructivo.

<sup>8</sup> Reyna, S (1999) determinó que las muestras extraídas en la zona media del contenedor se consideran suficientes, ya que en ensayos previos no se obtuvieron diferencias significativas entre el estrato medio y el superior, ni entre el medio y el inferior para una muestra de 10 plantas

La totalidad de raicillas extraídas de la muestra, se observaron en lupa binocular y clasificaron en tres categorías de conteo:

A/s/M : ápices radicales sin micorrizar.

A/c/T.m : ápices radicales micorrizados por *T. melanosporum*.

A/c/O.m : ápices radicales micorrizados por otras micorrizas.

El formulario confeccionado para tal registro se presenta en el Anexo N° 2.

Para el análisis cualitativo, el color y la forma de la micorriza fueron características morfológicas que en un primer reconocimiento de lupa permitieron su clasificación dentro de una especie determinada, ante la presencia de cualquier duda, el apoyo de un análisis microscópico fue fundamental, observando características anatómicas como el manto y la ornamentación y ramificación de las espínulas, que permitieron reconocer y verificar el tipo de micorriza.

Todas estas características fueron analizadas contrastando claves morfológicas para *T. melanosporum* de los trabajos de Zambonelli *et al.* (1993), Saez y de Miguel (1995), De Miguel y Saez (1997) y Etayo y De Miguel (1998) mencionadas en Reyna, (2000); junto con la experiencia profesional del Dr. Götz Palfner<sup>9</sup>.

#### 4.2.3. Diseño Experimental

##### ENSAYO I

El ensayo I consistió en 4 tratamientos representados por las especies en estudio. Se utilizó un diseño en bloques al azar simple con 3 repeticiones, con un tamaño muestral de 6 muestras de 7cc de cepellón de cada planta por repetición, tabla N°8.

Mediante un análisis de varianza con un 95% de significancia, realizado para un diseño en bloques al azar simple, se analizó la significancia de los tratamientos y bloques; para este análisis se trabajo con la proporción de raíces micorrizadas con *T. melanosporum* del total de la muestra para cada tratamiento; previo a este análisis, es necesario cumplir con los criterios de normalidad y homocedasticidad.

De acuerdo al modelo de bloques completos con submuestreo  $Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \zeta_j + e_{ij} + \xi_{ijk}$ , se probó la hipótesis nula que indica que no existe diferencias entre los tratamientos estudiados versus que sí existe diferencias entre ellos.

Además los promedios de los tratamientos se analizaron mediante el test de Duncan de comparaciones múltiples para un 95% de significación.

---

<sup>9</sup> Comunicación personal

Tabla N°8.- Diseño del Ensayo I, para cada Bloque (N° de bloques=3).

| Tratamiento | Especie                   | pH  | Población (plantas) | Muestra / bloque (plantas) |
|-------------|---------------------------|-----|---------------------|----------------------------|
| T I         | <i>Quercus ilex</i>       | 8,1 | 54                  | 6                          |
| T II        | <i>Quercus robur</i>      | 8,1 | 54                  | 6                          |
| T III       | <i>Nothofagus glauca</i>  | 8,1 | 54                  | 6                          |
| T IV        | <i>Nothofagus obliqua</i> | 8,1 | 54                  | 6                          |

## ENSAYO II

El ensayo II consistió en 4 tratamientos, descritos en la tabla N°9, se utilizó un diseño en boques al azar simple con 3 repeticiones, con un tamaño muestral de 6 muestras de 7cc de cepellón de cada planta por repetición.

Se trabajó el mismo método de análisis que para el ensayo anterior, utilizando la proporción de raíces micorrizadas con *T. melanosporum* del total de la muestra para cada tratamiento; previo cumplimiento de los criterios de normalidad y homocedasticidad. Además los promedios de los tratamientos se analizaron mediante el test de Duncan de comparaciones múltiples para un 95% de significación.

Tabla N° 9.- Diseño del Ensayo II, para cada Bloque (N° de bloques=3).

| Tratamiento | Especie                   | pH  | Población (plantas) | Muestra / bloque (plantas) |
|-------------|---------------------------|-----|---------------------|----------------------------|
| T I         | <i>Nothofagus glauca</i>  | 6,5 | 54                  | 6                          |
| T II        | <i>Nothofagus glauca</i>  | 7,7 | 54                  | 6                          |
| T III       | <i>Nothofagus obliqua</i> | 6,5 | 54                  | 6                          |
| T IV        | <i>Nothofagus obliqua</i> | 7,7 | 54                  | 6                          |

Por otra parte, también se evaluó la micorrización con otras micorrizas para cada tratamiento de este ensayo, siguiendo el mismo procedimiento anterior, con excepción de que se trabajó con el valor absoluto para cada tratamiento.

## 5. PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS

El estudio arrojó resultados promisorios, principalmente en el ensayo I, que permitirá dilucidar interrogantes iniciales sobre esta primera etapa de la producción de plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* en Chile. Por el contrario, los resultados obtenidos del ensayo II, mantienen incógnitas de temas que se discutirán.

### 5.1. Micorrización con *Tuber melanosporum* Vittadini, en invernadero

Según los parámetros de muestreo, ápices sin micorrizar, con *T. melanosporum* y con otras micorrizas, en la tabla N°10 se presentan los valores totales de ápices radicales evaluados por especie, extraídos de una muestra de 7cc, para un tamaño muestral de 18 plantas por especie.

Tabla N°10.- N° total de ápices radicales evaluados por especie, ensayo I.

| Especie           | N° de ápices radicales |                            |                      |       |
|-------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------|
|                   | Sin Micorrizas         | Con <i>T. melanosporum</i> | Con Otras micorrizas | Total |
| <i>Q. ilex</i>    | 864                    | 617                        | 33                   | 1514  |
| <i>Q. robur</i>   | 12700                  | 1222                       | 156                  | 14078 |
| <i>N. glauca</i>  | 1959                   | 30                         | 0                    | 1989  |
| <i>N. obliqua</i> | 7065                   | 683                        | 0                    | 7748  |

De la tabla anterior se observan diferencias significativas entre los sistemas radicales de las especies en estudio; de acuerdo a los análisis realizados para el ensayo I, el total de ápices radicales evaluados para *Quercus ilex* es de 1.514, y corresponde aproximadamente al 10% del total evaluados para *Quercus robur* y aproximadamente el 20% en relación a *Nothofagus obliqua*, situación similar sucede para *Nothofagus glauca* con 1.989 ápices. Estas diferencias son evidentes si se piensa que la mayor muestra de *Q. robur* llegó a tener 1.503 ápices evaluados, Anexo N°1, y deben ser consideradas para un mejor entendimiento de los resultados.

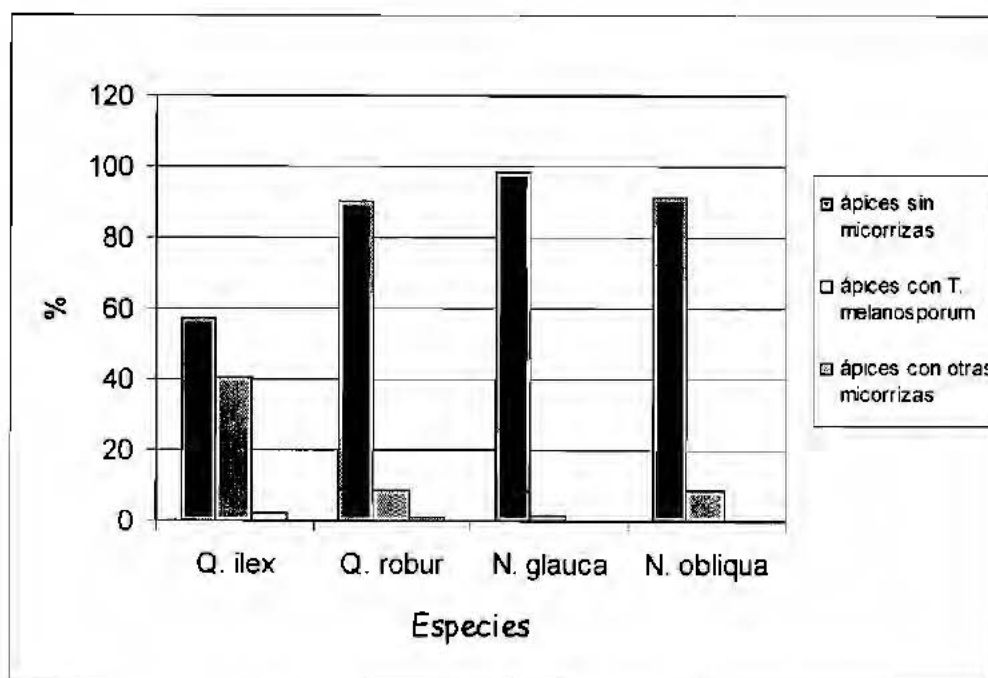
En la tabla N°11, se presentan los promedios de ápices evaluados por especie, obtenido para una muestra de 18 plantas, según cada parámetro de muestreo, con su respectivo Intervalo de Confianza  $\alpha=5\%$ . Además el número de plantas micorrizadas por *T. melanosporum* para el total de la población muestreada.

Tabla N° 11.- Promedio de ápices radicales evaluados por especie, ensayo I.

| Especies          | N° de ápices radicales |                            |                      | N° de plantas micorrizadas con <i>T. melanosporum</i> |
|-------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
|                   | Sin Micorrizas         | Con <i>T. melanosporum</i> | Con Otras micorrizas |                                                       |
| <i>Q. ilex</i>    | 48 ± 18                | 34 ± 12                    | 2 ± 4                | 17                                                    |
| <i>Q. robur</i>   | 706 ± 161              | 68 ± 30                    | 9 ± 10               | 14                                                    |
| <i>N. glauca</i>  | 109 ± 22               | 2 ± 1                      | 0                    | 7                                                     |
| <i>N. obliqua</i> | 393 ± 84               | 38 ± 21                    | 0                    | 13                                                    |

Enfocándose en los valores referidos para el número de ápices micorrizados con *T. melanosporum*, la desviación estándar para *Q. ilex* fue de 25 ápices radicales, *Q. robur* con 65 ápices, *N. glauca* con 3 ápices y para *N. obliqua* fue de 44 ápices radicales. Esta información es descrita para cada parámetro, incluyendo los valores máximos y mínimos, en el Anexo N° 3.

El gráfico N°1 muestra el porcentaje que representa el total de ápices sin micorrizar, con *T. melanosporum* y con otras micorrizas, con respecto al total de ápices evaluados para la especie.

Gráfico N° 1.- Porcentajes de micorrización con *Tuber melanosporum*, Ensayo I.

La presencia de *T. melanosporum* en las cuatro especies cultivadas en invernadero reflejan los resultados positivos obtenidos por el estudio, sin embargo, *N. glauca* fue la única especie, en este ensayo, que no obtuvo niveles de micorrización favorables. De un total de 1.989 ápices evaluados para esta especie, tabla N°3 del Anexo N°1, sólo 30 ápices radicales fueron micorrizados por *T. melanosporum*, equivalente a un 2 %, poco aceptable si además se considera que

las plantas de esta especie no tuvieron buena respuesta a los niveles de pH requeridos por el hongo.

Del gráfico N° 1, se destaca el porcentaje de micorrización de *Q. ilex*, con un 41% de ápices con *T. melanosporum* frente a un 9% de las especies *Q. robur* y *N. obliqua*; no obstante, al comparar el 9% de micorrización de *Q. robur* y *N. obliqua* con el número real de micorrizas obtenidas por estas especies, se comprueba que no existe relación; para lo cual se respaldan los resultados obtenidos a través del muestreo volumétrico propuesto por Reyna *et al.*, (2000). Especies que presentando el mismo porcentaje de micorrización, difieren notablemente en el número de micorrizas de *T. melanosporum*, con una diferencia de aproximadamente el doble a favor de la primera especie.

Llama la atención que la presencia del contaminante *Inocybe* sp. se centró en el género *Quercus*, aunque con porcentajes poco significativos. Al observar el gráfico N°1, la presencia de contaminantes es porcentualmente similar en ambas especies.

La tabla N°12, muestra la tasa de mortalidad de las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus glauca* y *Nothofagus obliqua*, evaluada a los 2 meses de realizada la inoculación.

Tabla N° 12.- Mortalidad de las especies, ensayo I.

| Especies              | <i>Quercus ilex</i> | <i>Quercus robur</i> | <i>Nothofagus glauca</i> | <i>Nothofagus obliqua</i> |
|-----------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Población Total       | 54                  | 54                   | 54                       | 54                        |
| N° de plantas muertas | 0                   | 0                    | 30                       | 1                         |
| % Mortalidad          | 0 %                 | 0 %                  | 56 %                     | 2 %                       |

Como se observa en la tabla N°12, la mortalidad para *N. glauca* fue crítica con más de un 50% de la población, esta respuesta desfavorable, se relaciona con el efecto de stress post-transplante presentado por esta especie frente a las otras en estudio, observado por un grado de marchitez severo con una pérdida de casi la totalidad de su sistema foliar.

Por ser el talco, según Cartié *et al.*, 1996, el coadyuvante que resulta ser menos fitotóxico para las plantas y más efectivo en cuanto a la producción de ápices micorrizados que los geles, se descartan los efectos del método de inoculación y el coadyuvante utilizado, en la respuesta obtenida por *N. glauca* a la inoculación con *T. melanosporum*, por lo cual se conjetura una intolerancia a las condiciones edáficas presentadas en el ensayo I, principalmente al nivel de pH 8,1.

De acuerdo a un análisis de varianza, realizado para un diseño en bloques al azar simple, se rechaza la hipótesis nula, ya que en los tratamientos los datos son significativos, Anexo N°4.

Sin embargo, las diferencias entre tratamiento se identifican al realizar un test de Duncan, el que indica que las especies *Q. robur* y *N. obliqua* son las únicas que NO presentan diferencias significativas en la proporción de ápices micorrizados con *T. melanosporum*, descrito en la tabla N° 13.

Tabla N°13.- Test de Duncan, con 95 % de significancia.

| Especies                  | Promedio <sup>a</sup> | Significancia |
|---------------------------|-----------------------|---------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 0.695                 | a             |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 0.262                 | b             |
| <i>Quercus robur</i>      | 0.236                 | b             |
| <i>Nothofagus glauca</i>  | 0.084                 | c             |

\* Promedio de la proporción de ápices micorrizados con *T. melanosporum* con respecto al total de la muestra evaluada.

Dentro de las especies analizadas *Q. ilex* presenta diferencias significativas, en torno a la proporción de ápices micorrizados con *T. melanosporum* con respecto al total de la muestra evaluada, frente a las otras especies en estudio..

## 5.2. Micorrización con *Tuber melanosporum* Vittadini, al aire libre

Para el análisis de la micorrización con *T. melanosporum*, se debe señalar que a la luz de los datos obtenidos, no es posible realizar un análisis de varianza, dado que las 5 muestras que presentaron ápices micorrizados con *T. melanosporum*, son insuficientes para la realización de este análisis. Por lo antes mencionado, este ensayo no podrá ser concluyente, sino más bien será un aporte para tema de discusión.

Según los parámetros de muestreo, ápices sin micorrizar, con *T. melanosporum* y con otras micorrizas, en la tabla N°14, se presenta el valor total de ápices radicales evaluados por tratamiento, extraídos de una muestra de 7cc, para un tamaño muestral de 18 plantas.

Tabla N°14.- N° total de ápices radicales evaluados por tratamiento, ensayo II.

| Tratamiento              | N° de ápices radicales |                            |                      | Total |
|--------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------|
|                          | Sin Micorrizas         | Con <i>T. melanosporum</i> | Con Otras micorrizas |       |
| <i>N. glauca</i> pH 6,5  | 1066                   | 0                          | 1541                 | 2607  |
| <i>N. glauca</i> pH 7,7  | 1112                   | 295                        | 675                  | 2082  |
| <i>N. obliqua</i> pH 6,5 | 3032                   | 0                          | 2693                 | 5725  |
| <i>N. obliqua</i> pH 7,7 | 1809                   | 5                          | 1716                 | 3530  |



En la tabla N°15, se presentan los promedios de ápices evaluados por tratamiento para cada parámetro de muestreo, con su respectivo Intervalo de Confianza  $\alpha=5\%$ . Además de el número de plantas micorrizadas por *T. melanosporum* para el total de la población muestreada.

Tabla N°15.- Promedio de ápices radicales evaluados por tratamiento, ensayo II.

| Tratamiento              | N° de ápices radicales |                            |                      | N° de plantas micorrizadas con <i>T. melanosporum</i> |
|--------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
|                          | Sin Micorrizas         | Con <i>T. melanosporum</i> | Con Otras micorrizas |                                                       |
| <i>N. glauca</i> pH 6,5  | 59 $\pm$ 17            | 0                          | 86 $\pm$ 25          | 0                                                     |
| <i>N. glauca</i> pH 7,7  | 62 $\pm$ 20            | 16 $\pm$ 22                | 38 $\pm$ 26          | 4                                                     |
| <i>N. obliqua</i> pH 6,5 | 168 $\pm$ 38           | 0                          | 150 $\pm$ 50         | 0                                                     |
| <i>N. obliqua</i> pH 7,7 | 10 $\pm$ 15            | 0                          | 95 $\pm$ 22          | 1                                                     |

Un promedio cero de micorrización con *T. melanosporum* obtenido por *N. obliqua* resulta desconcertante, si se considera que para el ensayo I esta especie obtuvo un promedio de 38 ápices micorrizados con este hongo; esto deja con una interrogante, que lleva a involucrarlo principalmente con la afinidad simbiótica que presentaría el roble a los hongos micorrizicos competitivos encontrados en este ensayo, fundamentado en sus altos promedios de ápices micorrizados por otras micorrizas, descritos en la tabla N° 15.

Esta afinidad puede darse por la amplia gama simbiótica que presenta esta especie. Carrillo *et al.*, 1992, determinó que la mayor riqueza de especies micorrizicas está en el bosque de *N. obliqua*, de un total de 114 especies arbóreas evaluadas, incluyendo micorrizas del tipo vesículo arbusculares, ectomicorrizas y orquicoide; dentro de este estudio, el roble representa un 1.8% de un 2.6% de las especies vasculares que presentaron ectomicorrizas.

El gráfico N°2 presenta el porcentaje que representa el total de ápices sin micorrizar, con *T. melanosporum* y con otras micorrizas, con respecto al total de ápices evaluados por tratamiento.

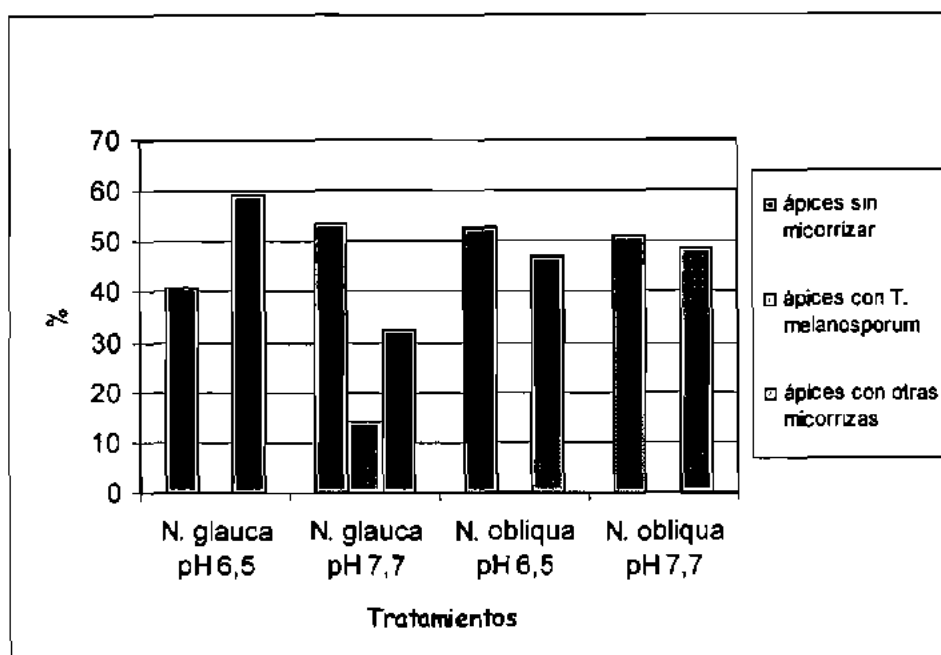


Grafico N° 2.- Porcentajes de micorrización con *Tuber melanosporum*, ensayo II.

Del gráfico anterior, resalta la presencia de *T. melanosporum* en *N. glauca* pH 7,7, con un 14% de micorrización para este tratamiento, al cual pertenecen 4 de las 5 muestras que presentaron micorrización con este hongo. Este resultado plantea la interrogante de obtener una mejor respuesta de esta especie bajo otras condiciones de cultivo de *T. melanosporum*, reduciendo los niveles de pH a un valor de 7,7, viable si se tiene en cuenta que este valor está dentro del rango requerido por el hongo.

La tabla N° 16, muestra la tasa de mortalidad de las especies para cada tratamiento, evaluada a los 2 meses realizada la inoculación. Para *N. glauca* en ambos tratamientos fue más favorable que en el ensayo I, con solo un 15% del total de la población de plantas inoculadas con *T. melanosporum*.

Tabla N°16.- Mortalidad de las especies para cada tratamiento, ensayo II.

| Especies        | Tratamiento I | Tratamiento II | Tratamiento III | Tratamiento IV |
|-----------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| Población Total | 54            | 54             | 54              | 54             |
| Muertas         | 8             | 8              | 0               | 0              |
| % Mortalidad    | 15 %          | 15 %           | 0 %             | 0 %            |

Teniendo en cuenta que no se tiene mayor conocimiento de los requerimientos de pH para esta especie, con los resultados obtenidos en los ensayos realizados, es factible deducir que hubo evidencia una mala respuesta en suelos con altos niveles de pH, esto al comparar la reacción de las especies de *Nothofagus* a los diversos niveles de pH sometidos, tanto en invernadero como al aire libre, en donde *N. glauca* presenta una mortalidad significativa en el mayor nivel de pH dentro del estudio, lo que podría reflejar que esta especie es crítica a un nivel de pH, entre 7,7 y 8,1.

Al aire libre, la micorrización con otros contaminantes obtenidos por las plantas, anula cualquier posibilidad de obtener una planta con adecuados niveles de micorrización con *T. melanosporum*, hecho lógico, si se piensa que las plantas fueron transplantadas a un sustrato con una fuente de hongos micorrícicos competitivos.

### 5.3. Otras micorrizas del estudio

Dado la abundante presencia de otras micorrizas en las muestras analizadas, es relevante realizar un análisis estadístico, a fin de establecer parámetros de discusión significativos.

De acuerdo a un análisis de varianza, realizado para un diseño en bloques al azar simple, se rechaza la hipótesis nula, ya que en los tratamientos los datos son significativos, Anexo N°5.

Sin embargo, las diferencias entre tratamiento se identifican al realizar un test de Duncan, el que indica que los tratamientos I (*N. glauca* pH 6,5) y IV (*N. obliqua* pH 7,7) son los únicos que no presentan diferencias significativas en el promedio de micorrización con otras micorrizas, descrito en la tabla N°17.

Tabla N°17.- Test de Duncan, con 95 % de significancia.

| Tratamiento                     | Promedio* | Significancia |
|---------------------------------|-----------|---------------|
| III ( <i>N. obliqua</i> pH 6,5) | 150       | a             |
| IV ( <i>N. obliqua</i> pH 7,7)  | 95        | b             |
| I ( <i>N. glauca</i> pH 6,5)    | 86        | b             |
| II ( <i>N. glauca</i> pH 7,7)   | 38        | c             |

\* Promedio del valor absoluto de raíces micorrizadas con otras micorrizas.

Para ambas especies de *Nothofagus* el pH tiene una relación indirecta con los niveles de micorrización de otras especies de hongos, sin embargo, a pesar de la variación de pH, *N. obliqua* presenta un mayor número de raíces micorrizadas por otras micorrizas con respecto a *N. glauca*.

El pH como factor crítico para la especie *N. glauca*, vuelve a ser tema de discusión, conjeturando que además de ser decisivo para su desarrollo, influencia en sus niveles de micorrización.

La presencia del cuerpo fructífero es esencial para el reconocimiento y clasificación de una ectomicorriza, sin embargo, las especies ectomicorrícicas contaminantes encontradas en el estudio fueron analizadas y descritas de acuerdo a las características mencionadas en la tabla N°18.

La presencia de ciertas características morfológicas, como las fíbulas en los tipos A1, A3 y A4, o los rizomorfos encontrados en los tipos A2 y A3, hacen suponer que se trata de especies de la clase basidiomicetes, por ser estructuras típicas y comúnmente asociadas a esta clase de hongos, según Smith y Read, (1997).

Tabla N° 18 .- Morfotipos de las otras micorrizas encontradas en el estudio.

|                                     | Tipo A1                                   | Tipo A2                                      | Tipo A3                                                 | Tipo A4                                                    |
|-------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Fitobiontes                         | N. glauca – N. obliqua                    | N. obliqua                                   | N. glauca – N. obliqua                                  | Q. ilex – Q. robur<br>N. obliqua                           |
| Ensayo                              | Aire libre<br>Tratamiento I,II,III,IV     | Aire libre<br>Tratamiento IV                 | Aire libre<br>Tratamiento I,II,III,IV                   | Invernadero (Q. ilex; Q. robur)<br>Aire libre (N. obliqua) |
| Género                              | Desconocido                               | Desconocido                                  | Tomentella                                              | Inocybe                                                    |
| <b>Características morfológicas</b> |                                           |                                              |                                                         |                                                            |
| Color micorriza                     | Blanco - amarillento                      | Blanco brillante                             | Amarillo-ocre cuando joven y café oscuro en la madurez. | Blanco pálido a descolorido                                |
| Micelio extraradical                | Ausente                                   | Abundante, blanco algodonoso                 | Poco abundante, Amarillento a café                      | Abundante, algodonoso                                      |
| Rizomorfos                          | Ausentes                                  | blancos                                      | amarillentos a café oscuro.                             | Ausentes                                                   |
| <b>Características anatómicas</b>   |                                           |                                              |                                                         |                                                            |
| Manto exterior                      | Pseudoparenquimático, patrón epidermoide. | Plectenquimático, compacto, de hifas cortas  | Pseudoparenquimático, patrón poligonal                  | Plectenquimático                                           |
| Cistidios                           | Ausentes                                  | Sólo en rizomorfos, claviformes o utriformes | Cistidios con ramificación uni o bilateral.             | Ausentes                                                   |
| Fibulas                             | Presentes                                 | Ausentes                                     | Presentes                                               | Presentes                                                  |

### 5.3.1. Fotos de las otras micorrizas del estudio



Foto N° 10.- Micorriza Tipo A1.



Foto N° 11.- Manto micorriza Tipo A1.



Foto N° 12.- Micorriza Tipo A2.

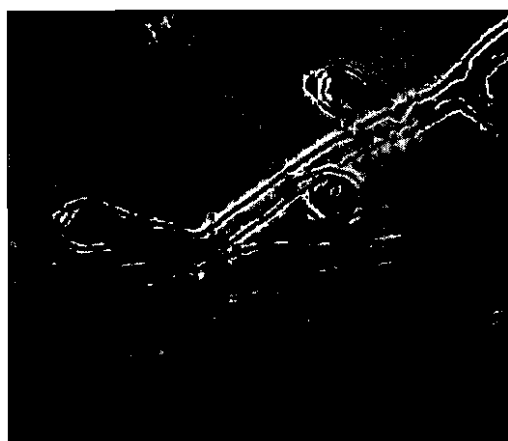


Foto N° 13.- Rizomorfo micorriza Tipo A2.

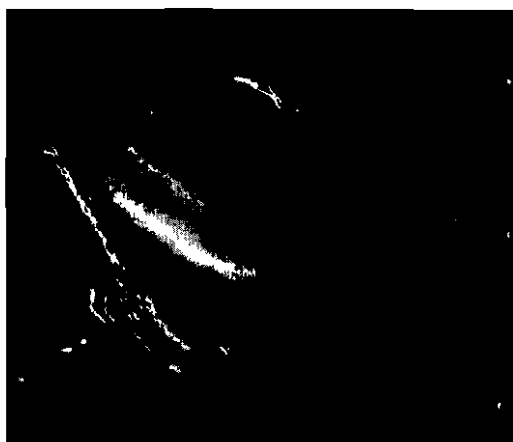


Foto N° 14.- Micelio y rizomorfo del Tipo A2.



Foto N° 15.- Raíz micorrizada con Tipo A1 – A3.



Foto N° 16.- Micorriza Tipo A3.



Foto N° 17.- Manto micorriza tipo A3.

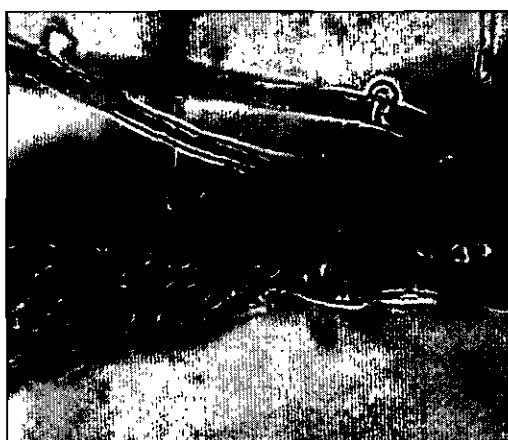


Foto N° 18.- Rizomorfo micorriza Tipo A3.



Foto N° 19.- Cistidios de micorriza Tipo A3.

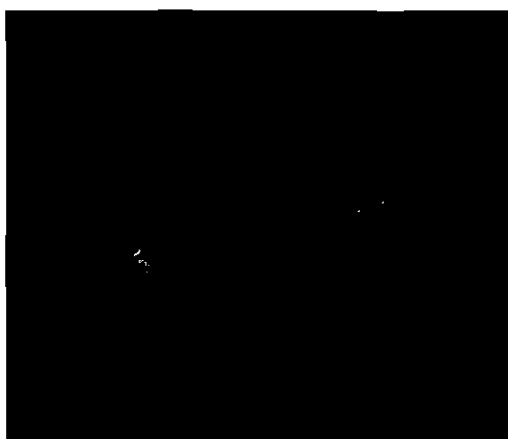


Foto N° 20.- Micorriza Tipo A4.



Foto N° 21.- Micorriza Tipo A4.

#### 5.4. Fotos de los morfotipos de las micorrizas de *Tuber melanosporum* para cada especie en estudio

Especie: *Quercus ilex*



Foto N° 22.- Micorriza joven de *Tuber melanosporum*.



Foto N° 23.- Manto en puzzle.

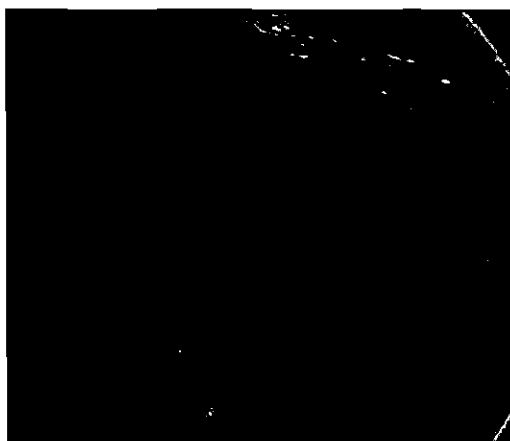


Foto N° 24.- Cistidios de la micorriza.



Foto N° 25.- Micorriza adulta de *Tuber melanosporum*.

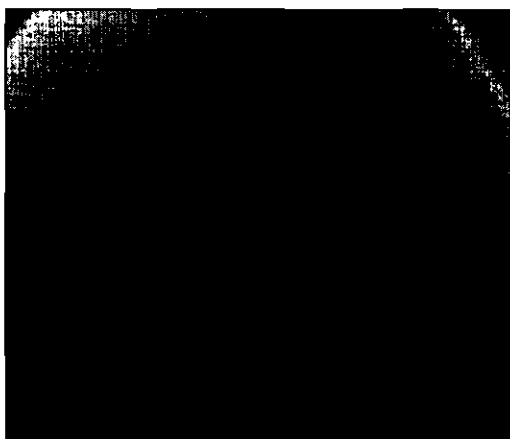


Foto N° 26.- Cistidios de micorriza adulta.



**Especie:** *Quercus robur*

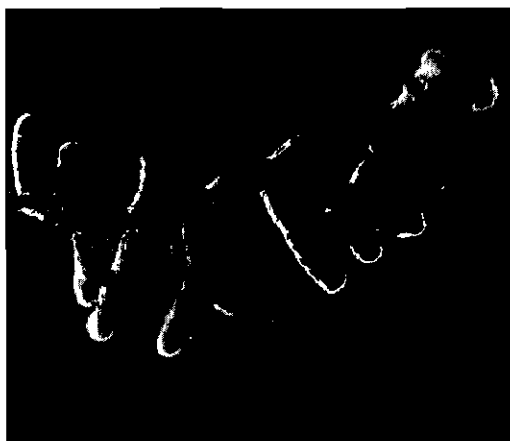


Foto N° 27.- Raíz micorrizada, sección I.



Foto N° 28.- Raíz micorrizada, sección II.



Foto N° 29.- Cistidios en ángulo recto.

**Especie:** *Nothofagus glauca*



Foto N° 30.- Aglomeración de micorriza de  
*Tuber melanosporum*.

**Especie:** *Nothofagus obliqua*



Foto N° 31.- Aglomeración de micorriza de *Tuber melanosporum*.



Foto N° 32.- Micorrizas de *Tuber melanosporum*.

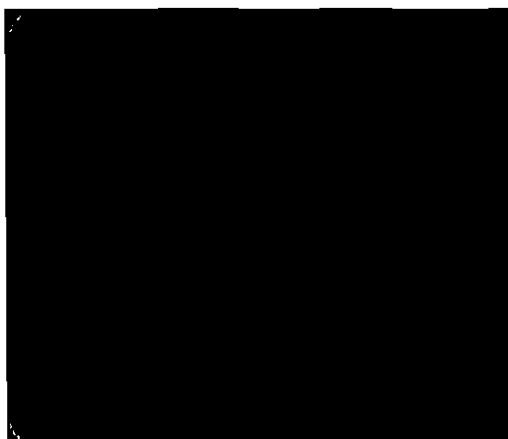


Foto N° 33.- Cistidios de la micorriza

**Especie:** *Nothofagus glauca*, Ensayo II, Tratamiento II.



Foto N° 34.- Micorriza de *Tuber melanosporum*.



Foto N° 35.- Manto en puzzle.

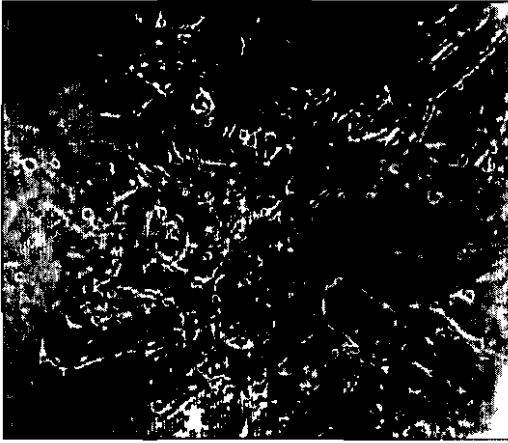


Foto N° 36.- Red superficial de hifas.

## 6. CONCLUSIONES

Ante la visualización del cultivo de trufas como una alternativa de producción ligada al sector agroforestal, se puede indicar que la primera etapa de este cultivo, concerniente a la micorrización de *Tuber melanosporum* Vittadini en las cuatro especies en estudio, es factible de acuerdo a los resultados obtenidos, para el método probado.

A fin de lograr buenos niveles de micorrización es necesario realizar el proceso bajo condiciones de asepsia, que permitan un cultivo libre de agentes contaminantes. Esto basado en los niveles de micorrización obtenidos en el ensayo realizado en invernadero, en contraste con los niveles de micorrización no evaluables conseguidos en el ensayo efectuado al aire libre.

Para el ensayo I, los análisis estadísticos presentan a *Quercus ilex* con diferencias significativas en la proporción de ápices micorrizados con *T. melanosporum*, en torno al resto de las especies, lo que permite concluir que bajo las condiciones dadas en este estudio, esta especie se presenta como la mejor opción para la producción de *T. melanosporum*, por demostrar ser una especie eficiente en la micorrización con este hongo; reduciendo la cantidad de ápices no micorrizados posibles de ser contaminados por otras micorrizas en terreno.

Si se analiza la fiabilidad de la población de plantas micorrizadas por *T. melanosporum* en las especies del ensayo I, se obtiene otro factor favorable a *Q. ilex*, por su efectividad presentada en relación al número de plantas micorrizadas por *T. melanosporum* con respecto al total de la muestra evaluada.

Con respecto a los resultados de las especies del género *Nothofagus* para el ensayo I, se distingue *Nothofagus obliqua* por sus niveles de micorrización, comparables con la micorrización de fitosimbiontes naturales de *T. melanosporum*, como la especie *Quercus robur*, hecho destacable por ser una especie nativa e incursionar en la simbiosis con una especie de hongo introducido y artificialmente cultivado.

Por lo anterior, es posible afirmar que *N. obliqua* es una alternativa real para la micorrización con *T. melanosporum*; por presentar un buen desarrollo fisiológico ante los requerimientos de cultivo del hongo en estudio y desarrollar micorrizas de *T. melanosporum* claramente definidas, teniendo en cuenta las condiciones de asepsia para su cultivo.

La especie *Nothofagus glauca*, a pesar de presentar ápices radicales micorrizados con *T. melanosporum*, para las condiciones de cultivo presentadas en el ensayo I, no resulta ser una especie favorable para la micorrización, ni menos una especie productivamente viable, debido principalmente a su intolerancia a estas condiciones, en las cuales presentó una respuesta negativa reflejada en el alto porcentaje de mortalidad y una baja micorrización.

A la luz de los resultados, en el análisis de otras micorrizas para el ensayo II, se evidencia un significativo efecto del carbonato de calcio, en relación a la disminución de los niveles de micorrización con otras micorrizas a medida que aumenta el pH, para ambas especies de *Nothofagus*. El proceso de encalar tenderá a disminuir el efecto competitivo de otros hongos, hecho beneficioso para la micorrización con *T. melanosporum*, el cual se presenta como un hongo poco competitivo frente a micorrizas nativas.

Los resultados positivos alcanzados en este estudio, constituyen el primer paso para un cultivo productivo de la trufa de Perigord en Chile, demostrando la posibilidad de producir plantas con adecuados niveles de micorrización. Sin embargo, los resultados productivos son desconocidos, presentando las etapas posteriores que involucran el transplante, su adaptabilidad y desarrollo en terreno como los pasos siguientes a ser estudiados y cuyos resultados probarán la factibilidad de este cultivo como una nueva alternativa viable de producción para el sector agroforestal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AGERER, R. 1991. Colour Atlas of the ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag. Eduard Dietemberger. Munich. 35-40; 135- 140.

AGUILERA, H y DELGADILLO, M. 2000. Evaluación de la simbiosis entre *Suillus Luteus* y *Pinus radiata* D. Don en la germinación y posterior crecimiento. Seminario de Ingeniería Ejecución Forestal. Universidad Católica del Maule, Escuela de Ciencias forestales. Talca, Chile. 64 p.

BONET, J.A; FISCHER, C Y COLINAS, C. 2001. Evolución mensual en campo de las ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt. inoculadas en plantas de *Quercus ilex*. Montes para la sociedad del nuevo milenio. III Congreso Forestal Español. Ed. Junta de Andalucía. Granada, España.

BORIE, F y RUBIO, R. 1986. Micorrizas: Su rol en ecología y nutrición vegetal. Revista Próxima década N° 48: 9-13.

CARRASCO, N. 1998. Evaluación de seis especies de micorrizas, aplicadas a *Eucalyptus nitens* Maiden en contenedores en vivero Pisagua. Seminario de Título Técnico universitario forestal. Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, Departamento Forestal, Los Ángeles, Chile. 70 p.

CARRILLO, R; GODOY, R y PAREDO, H. 1992. Simbiosis micorrízica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile. Revista Bosque N°13(2): 57-67. Chile.

CARTIÉ, G; PALAZÓN, C; DELGADO, I y BARRIUSO, J. 1999. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt. y en la supervivencia de las plantas. V Congreso Internacional sobre la Ciencia y el Cultivo de la trufa. Francia. 8 p.

CARTIÉ, G; PALAZÓN, C; BARRIUSO, J y DELGADO. 1996. Un nuevo método de inoculación de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt. Revista Ciencia y Técnica N° 46: 40-43.

CONAF. 1998. Experiencia Silvicultural del Bosque Nativo de Chile. Recopilación de Antecedentes Para 57 Especies Arbóreas y Evaluación De Practicas Silviculturales. Proyecto Manejo Sustentable del Bosque Nativo. Santiago, Chile. 420 p.

CONAF-INFOR. 1998. Potencialidad de Especies y Sitios para una Diversificación Silvícola Nacional. Monografía de ROBLE *Nothofagus obliqua*. Santiago, Chile. 88 p.

DE MIGUEL, A.M y SÁEZ, R. 1997. Aspectos sobre truficultura en Navarra (España). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra. España. Serie botánica 10: 3-9.

DE MIGUEL, y SÁEZ, R. 1997. Análisis de micorrizas en truferas cultivadas de Navarra (España). Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie botánica. España. N° 10: 11-18.

DE ROMAN, M; DE MIGUEL, A.M & ETAYO, M.L. 1999. Ectomycorrhizal morphotypes identified in two sites (Burned and non- disturbed) in a *Quercus ilex* L. subsp. *Ballota* (Desf.) samp. fores in Navarra. Publicaciones de biología, Universidad de Navarra. España. Serie botánica 12: 45-47.

DONOSO, C. 1981. Ecología Forestal, el bosque y su medio ambiente. Editorial Universitaria, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 368p.

DONOSO, C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria S.A. Santiago, Chile. 31p.

ETAYO, M. L. Y DE MIGUEL, A. M. 1998. Estudio de las Ectomicorrizas en una Trufera cultivada situada en Olóriz (Navarra). Publicaciones de Biología. Universidad de Navarra. Pamplona, España. Serie botánica N°11. pág 55-114.

FISCHER, C Y COLINAS, C. 1997. Propuesta de metodología para la certificación de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum* para aplicación comercial. Comunicación presentada en la Reunión de Coordinación de INIA sobre Truficultura, celebrada en el Centro de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón en Zaragoza. Soria, España.

HARTMANN, H. Y KESTER, D. 1987. Propagación de plantas; Principios y practicas. Compañía editorial continental, S.A. México. 760 p.

HEMARD, C., ILABACA, C., JEREZ, G., SANDOVAL, P., ULLOA, A. 2000. Aspectos generales de las Micorrizas [En línea] Cursos Universidad de Chile. [Http://146.83.41.80/curso/fivegf/mico.htm](http://146.83.41.80/curso/fivegf/mico.htm)

HERNANDEZ, A. 2000. Las micorrizas [En línea] Revista Terralia. [Fecha de Consulta: Junio 2002. [Http://www.terralia.com/revista14/pagina12.htm](http://www.terralia.com/revista14/pagina12.htm)

IPINZA, R Y GRANGE, M. 1983. Micorrizas en Silvicultura. Revista Próxima década N° 17 pág 14-21.

IPINZA, R Y GRANGE, M. 1986. Micorrización Simbiosis Vegetal que favorece la Producción. Revista El campesino N° 7 pág 7-1.

MAMOUN, M; OLIVER, JM. 1993. Competition between *Tuber melanosporum* and other ectomycorrhizal fungi, under two irrigation regimes. Plant and Soil 149 pág 219-225.

MARTINEZ DE ARAGON, J; BONET, J y COLINAS, C *et al.* 1998. Producciones de setas micorrícicas y comestibles en la comarca del Solsones. España.

MENA, D. 1994. Ensayo de Germinación de tres especies del genero *Quercus*. Tesis de la escuela de Tecnología Forestal, Universidad Católica del Maule. Talca, Chile. 6-8 p.

PALAZÓN, C; CARTIÉ, G, DELGADO, I y BARRIUSO, J. 1999. Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus spp.*) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt., para la obtención, en España, de la etiqueta de certificación. Abstract V International Congress Science and cultivation of truffle, Aix - en Provence. España.

PERA, J; ALVAREZ, I y PARLADE, J. 1998. Eficacia del inoculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor. Barcelona, España. Vol. 7 (1 y 2)

PEREIRA, G. 2002. Micorrizas, Suelos degradados y Silvicultura de precisión. Chile Forestal Enero-Febrero 2002. 27-28 p.

REYNA, S. 2000. Trufa, Truficultura y Selvicultura Trufera. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 229 pp.

REYNA, S. 1999. Aproximación a una selvicultura trufera. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. España. 325 pp.

REYNA, S; BORONAT, J y PALOMAR, E. 2000. Control de calidad en la planta micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. producida por viveros comerciales. Revista Montes, ciencia y técnica. Nº 61. Pág 17-24.

RODRIGUEZ, J.A; DOMINGUEZ, J.A; TEYSSIERE, M Y SÁIZ DE OMEÑACA, J.A. 2000. Especificidad del hongo de micorrización *Tuber melanosporum* Vitt. sobre distintas plantas simbioses. U.D Patología forestal. Departamento de silvicultura, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid. España.

SÁEZ, R y DE MIGUEL, A.1995. La trufa negra *Tuber melanosporum* Vitt. Guía Práctica de Truficultura. Edita I.T.G. Agrícola S.A. Universidad de Navarra. Pamplona, España. 94 p.

SANTELICES, R. 1997. Antecedentes sobre el *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. Revista Académica de la Universidad Católica del Maule. Talca, Chile. Nº22:21-31.

SMITH, S.E., READ, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego. 605 p.

TORMO, R. 2001. Lecciones hipertextuales de botánica. [En línea] Universidad de Extremadura, España. <<http://www.unex.es/botanica/presenta.htm>>.



URRUTIA, J. 1986. Análisis bibliográfico y pictórico de semillas y sus procesos germinativos para 32 especies forestales nativas. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 113-114.

VENEGAS, C. 2003. Alcances y proyección de las micorrizas en la producción silvícola en Chile. Tesis de Ingeniería Forestal. Universidad Católica del Maule, Escuela de Ciencias forestales. Talca, Chile. 66 p.

## ANEXO 3.1.

### **Introduction and cultivation of *Tuber melanosporum* Vitt. in Chile**

Ricardo Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Pérez<sup>1</sup>, Santiago Reyna<sup>2</sup> and Rómulo Santelices<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Forestales, Universidad Católica del Maule, Avenida San Miguel 3605, Talca, Chile.

<sup>2</sup>Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, Parque Tecnológico, C/Charles R. Darwin, 14, E-46980 (Paterna) Valencia, Spain.

#### **Summary**

The climatic conditions of some areas in Chile are very similar to the best truffle producing areas in Europe. These areas are located primarily in the central valley between 35° and 40° S latitude and in the colder locations of the Andes foothills between 33° and 35° S. However, contrary to Europe where soils commonly present a high pH (7.5 to 8.5) most of the appropriate soils in Chile have a pH ranging from 5.5 to 7.0. This discrepancy in pH can be corrected by means of lime application.

To investigate the field behaviour and growth of *Tuber melanosporum* in Chile several agricultural sites under different environmental conditions have been selected in the VII Region where experimental truffières will be established.

Currently we have implemented the mycorrhizal plant production under greenhouse conditions. In November 2002, seedlings of *Quercus ilex*, *Q. robur* and *Corylus avellana* were inoculated using dried spore inoculum of *T. melanosporum* imported from "Castellón" Spain, which was mixed with inert talcum powder as a coadjutant. Seedlings were produced in a greenhouse using local seed provenances which provide eco-types best adapted to the study area. We have also inoculated seedlings of the native species *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca* which are well adapted to the Mediterranean region in Chile.

Based on mycorrhizal analyses, the presence of *Tuber melanosporum* has been confirmed in all species 10 months after inoculation. Results obtained in mycorrhizal analysis indicate that the inoculation techniques have been successful and they allow to address our future works to optimize the cultivation conditions.

#### **Introduction**

Truffle cultivation until today has been achieved by a limited number of countries in the northern hemisphere, primarily France, Italy and Spain (Reyna, 2000). Lately it has been introduced in United States, New Zealand and Australia where their production is beginning today (Hall, et al., 2001). Works are also known in Israel, South Africa and Argentina (Reyna, 2000; Reyna 2002).

Currently truffle cultivation methods are based on the obtaining of mycorrhized plants under greenhouse controlled conditions, techniques initially developed in France and Italy which are maintained as commercial secrets. Unfortunately, despite the production of several hundred thousand truffle-infected trees each year, and the establishment of large areas of artificial truffières, this has not halted the downward trend in production (Reyna, 2002). This situation could be due to competition of native ectomycorrhizal fungi during greenhouse mycorrhization process as well as the later field cultivation, what has generated variable yields in plantations. Also, the experience in Europe shows that the same cultivated plants in a different way and in different environments they can behave in a diametrically opposed way. This means that ecological conditions and cultivation techniques, are decisive for success of the production. (Bencivenga, 1999).

Current truffières settled down in New Zealand and United States, show that by means of suitable techniques, truffle production is possible in areas where climate and soils conditions are not ideals (Hall *et al.*, 2001).

The offer of Chilean edible mycorrhizal mushrooms concentrates on few species with a relatively low commercial value (Ej. *Suillus luteous* and *Lactarius deliciosus*), which have been introduced in accidental way and they are harvested exclusively in *Pinus radiata* extensive plantations. Currently this offer has manifested quality and yields problems, associates mainly to climate factors, unsuitable methods of harvest and post-harvest, unsuitable forest managing and the scarce knowledge on mushrooms auto-ecology, that which limits the efforts to improve their production.

The introduction in Chile of high value ectomycorrhizal fungi from northern hemisphere and the development of cultivation techniques offers an excellent opportunity for the creation of new industries which provide diversification options for rural agricultural communities. *Tuber melanosporum* is one of the more valued species in international markets, also out planting sites in some areas of Chile may be ideal for plantations of inoculated seedlings because they lack competing ectomycorrhizal fungi and fruiting would occur during the out-of-season period in Northern Hemisphere markets, which led us to attempt its cultivation.

### **Agroecological conditions for truffle cultivation in Chile**

Contrary to Europe, where soils commonly present a high pH (7.5 to 8.5), most soils in Chile present a relatively low pH (ranging from pH 5.5 to 7.0). There are some areas that present calcareous soils (high pH), however, they are located outside areas with suitable climates for truffle introduction. The main calcareous deposits in Chile are between the I and IV Region, where temperature and rainfall conditions are unsuitable for truffières establishment.

Favourable areas to establish truffle plantations can be located in central southern Chile, mainly between VII and X Region (35° to 40° S latitude), where climate predominant is a Mediterranean Temperate. Regarding truffle soils requirements, which should have a high pH, possible areas to implant exists in the Metropolitan Region (Maipo Valley) and VI Region, where some soils derive of alluvial deposits (mollisols) with high content of calcareous material in the profile. However, irrigation necessities in these areas are higher. The VII and X Region present areas with a more suitable climate, but calcareous soils do not exist, for this reason strong lime amendments should be carried out to correct this discrepancy in pH. It is necessary to highlight that truffle cultivation is not very demanding for soil fertility, also *Tuber melanosporum* can grow in a relatively wide range of temperatures and rainfall, this is interesting since plantations can settle down in Andean foothills areas and in marginal soils, not competing for sites with intensive crops.

**Table 1. Comparisons of some climate parameters of European truffières areas with a typical Mediterranean area of Chile.**

| PARAMETERS                                                      | Range in France and Italy | Range in Spain                      | Molina, Chile (35° S) |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| Annual rainfall (mm)                                            | 600 to 1500 mm            | 500 to 900 mm                       | 900 mm                |
| Mean annual Temperature                                         |                           | 11 to 14 °C                         | 13.8°C                |
| Mean daily temperature in summer (January, Southern hemisphere) | 17.5 ° to 22 °C           | 19 to 23 °C<br>(optimum 20 to 22°C) | 19.9°C                |
| Mean daily temperature in winter (July, Southern hemisphere)    | 1 to 8°C                  | 1.6 to 8.2 °C<br>(optimum > 2°C)    | 7.9 °C                |
|                                                                 | Hall, 2001                | Reyna, 2000                         |                       |

*T. melanosporum* and hosts have specific environmental requirements. The selection of suitable tree species for truffle cultivation must considerate specific local requirements. It is remarkable that in Chile there are suitable host species with a good ecological adaptation. For example, naturalized *Q. robur*, *Q. ilex* and *Corylus avellana* which grow good in central southern Chile. This situation is very advantageous since suitable vegetal material is ensured for inoculations and out planting. We have also selected for inoculation the native species *Nothofagus obliqua* and *N. glauca* which are well adapted to the Mediterranean region in Chile.

## **Mycorrhizal plant production**

### **Inoculant obtention**

The obtaining of a high quality inoculum is indispensable when planning a inoculation programme with *Tuber melanosporum*, Vitt. First, the collect time should be appropriate, since it should be assured that the truffles have a good ripeness. Another important aspect is a correct species identification, since in the European plantations is common the fruiting of other truffles species, for example *Tuber brumale*, which can cause confusion. For this reason product selection was made strictly for that program does not fail due to contaminations or unsuitable inoculants.

The truffles were collected in a private property, located in "El Toro", Castellón, Spain. This plantation occupies an approximate extension of a hectare and has above thirty years old. It is formed by Holm Oak trees (*Quercus ilex* ssp *ballota*), it is to an altitude of 1000 meters above sea level, the climate of that area is a continental Mediterranean. The soil is a silt loam, stony, with equilibrate texture, overlaying a limestone base.

In total three kilograms of truffle were collected between 18 to 25 January of 2002. The total number of ascocarps obtained was 81, with diameters that oscillated between 2.5 cm to 10.5 cm. Once transferred the truffles to the laboratory, it was proceeded to carry out their cleaning and disinfections. Each ascocarp was carefully brushed and whole earth and small stones stuck were completely removed, then truffles were soaked in 5% sodium hypochlorite during 20 minutes for disinfection.

Truffles were cleansed and disinfected rigorously, then samples of glebe portions were taken to confirm by means of spores analysis the species which we tried. This preparation was observed by means of microscope 400x and with help of specialized bibliography *Tuber melanosporum* spores were identified.

The characteristics of the spores and asci (table 2) totally coincided with the exposed ones in bibliography (Astier, 1998; Rioussel, *et al.*, 2001; Reyna, 2000).

**Table 2. Asci and spores characteristics**

|                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| Ascospores          | globular, peduncled               |
| Asci major axis     | 80-120 $\mu$                      |
| Asci minor axis     | 90-140 $\mu$                      |
| Spores number/ asci | between 1 and 6                   |
| Spore major axis    | 29-35 $\mu$                       |
| Spore minor axis    | 20-26 $\mu$                       |
| Spore shape         | elliptical                        |
| Spore ornamentation | short rigid and very dense spines |
| Spore colour        | Dark brown                        |

Truffle inoculum was prepared using crushed truffle and later on dehydrated in controlled way

## Inoculation and cultivation techniques

Truffle inoculation program was carried out by means of a semi-controlled process. A tunnel greenhouse was implemented which possesses a ventilation and temperature control system by means of two cooling units and indirect combustion boiler, it also possesses a microjets system for watering. Greenhouse was installed in Universidad Católica del Maule, located in Talca, Chile. As hygiene control, a disinfection foot-bath was installed in greenhouse entrance and the floor was also covered with a polypropylene mesh (Covertex®). On the other hand watering water quality is controlled strictly. chloride water is used that is rested in a storage pond so that it loses the chlorine before entering to the greenhouse, also settled a filter cleanser.

All controls have as objective to achieve hygiene and security conditions that allow a suitable development of the inoculation process, diminishing risks of contaminations with other ectomycorrhizal fungi that can compete with *Tuber melanosporum*, Vitt. inside greenhouse environment.

Seeds of the species *Quercus ilex*, *Q. robur*, *Nothofagus obliqua* and *N. glauca* were subjected to a disinfection process by means of 5% sodium hypochlorite and later on seeds were washed with sterilized water. They were disinfected and immediately sowed in trays under greenhouse conditions.

For *Corylus* seeds, Shells were removed and kernels were soaked in 5% sodium hypochlorite during 20 minutes. Then were washed with sterilized water (three changes) and later soaked in 100 ppm GA3 during 24 hours. Finally, seeds were washed again and disinfected with 30 volumes H2O2 during 10 minutes before sowing. It was used as germination substrate a 50:50 perlite/vermiculite ratio.

In November 2002, seedlings of *Quercus ilex*, *Q. robur* and *Corylus avellana* were inoculated by root dusting, using dried spore inoculum of *T. melanosporum* imported from "Castellón" Spain, which was mixed with inert talcum powder as a coadjuvant. All inoculations were made on naked roots, before transplanting to 450 ml and 650 ml Containers. This inoculation method is based on works developed by Cartié *et al.* (1999) including adaptations regarding substrate, containers, inoculum concentration and cultivation conditions. Seedlings were produced in a greenhouse using local seed provenances which provide eco-types best adapted to the study area. We have also inoculated seedlings of the native species *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca* which are well adapted to the Mediterranean region in Chile.

## Mycorrhizal analysis

We carried out the mycorrhizal analysis of inoculated plants with *Tuber melanosporum*, for species *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca*, after 10 months of greenhouse incubation, following a technique developed by Reyna (1999) for *Q. ilex*. Samples of 20 plants for each specie, were extracted in random way. A 7 ml sample, equivalent to 2% volume of each root ball, was taken using a cylindrical corer 1.27 cm in diameter and a length equivalent to the width of the container. Each sample, approximately 100 cc of water added along with a surfactant (Tween 80). The contents of the container were then transferred to 0.5 liters vessels and water added up to the 500 ml mark. Several successive rinsing and decanting were then performed for 1 minute each and order to free the root samples of clay, silt and some of the organic matter. Considerable care was taken to assure that root tips were not lost. The samples were then inspected with microscope and the binocular magnifying lens, and the number of *Tuber* mycorrhiza, non-mycorrhizal tips and contaminated tips were counted. These data were related to the volume of the original sample.

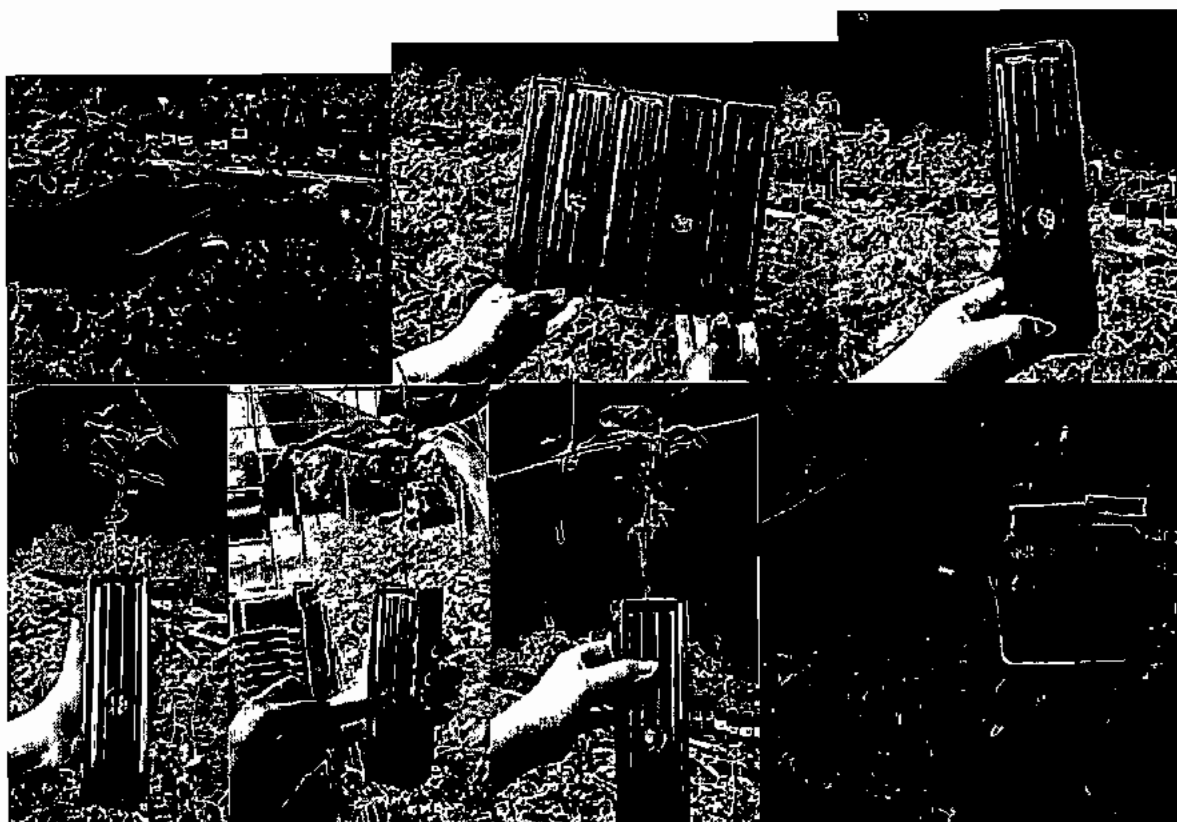


Figure 1. mycorrhizal root samplings

In case of doubts on the recognition of some mycorrhizal tips, samples were taken and observed in the microscope to analyze their morphological features and to confirm *T. melanosporum* mycorrhiza. The information obtained in microscopic analysis was contrasted with works published in specialized bibliography (Zambonelli, et al. 1993; Rausher, Agerer, and Chevalier, 1995; Etayo y de Miguel, 1998; Reyna, 1999).

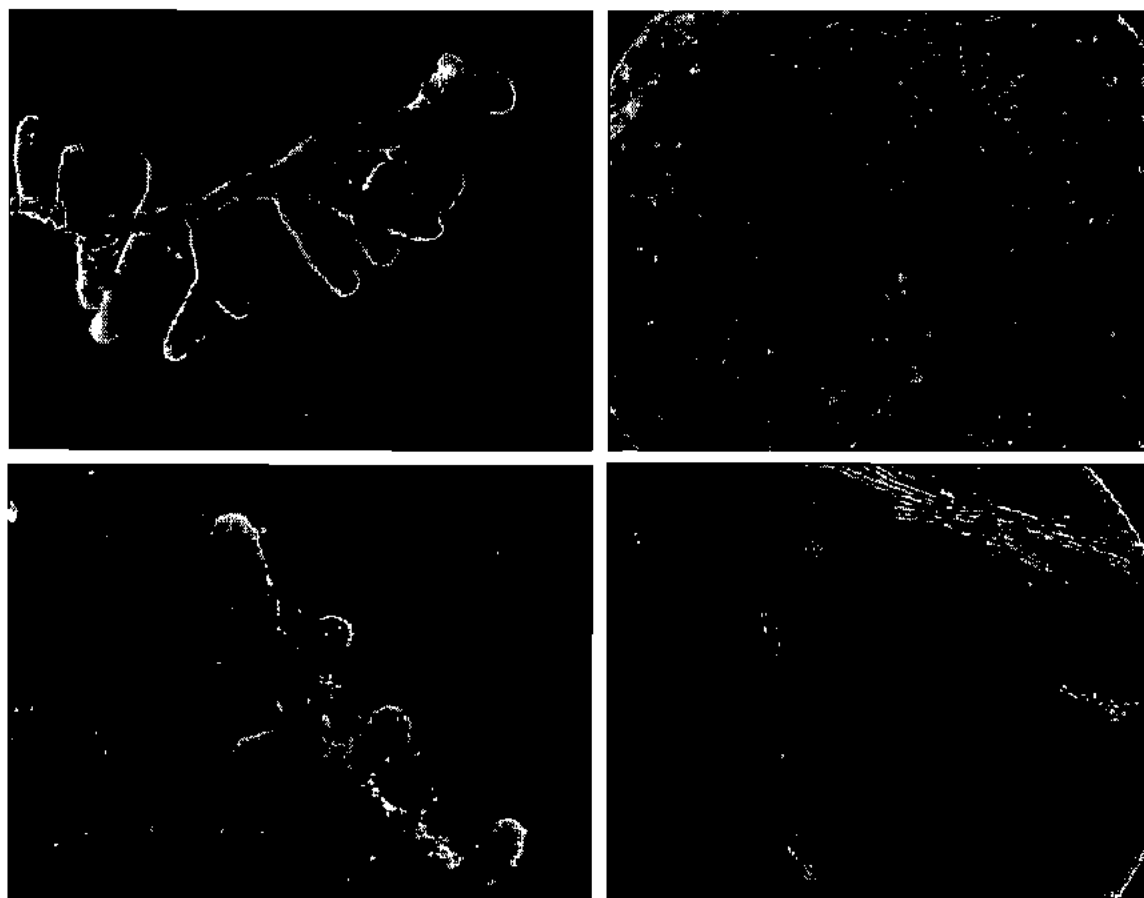
Table 3. mycorrhizal quality criteria applied for *T. melanosporum*

| Number of mycorrhizal root tips per plant | Standard of infection |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| 1-100                                     | Inadequate            |
| 101 -250                                  | Low                   |
| 251-500                                   | Acceptable            |
| 501- 1500                                 | Good                  |
| 1500-3000                                 | Very good             |
| > 3000                                    | Excellent             |

The results of mycorrhizal analysis carried out in our samplings are shown in Table 4.

**Tabla 4. Quality control of the analyzed lots regarding to proposed approach**

| Host                      | Average of mycorrhizal root tips per plant | Standard of infection | Observations                                                                 |
|---------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 2.338                                      | Excellent             |                                                                              |
| <i>Quercus robur</i>      | 2.957                                      | Excellent             | Some contaminations were presented with <i>Inocybe</i> sp. (non significant) |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 2.672                                      | Very good             |                                                                              |
| <i>Nothofagus glauca</i>  | 107                                        | Low                   |                                                                              |



**Figure 2. Range of mycorrhizal diagnostics features used for identification**

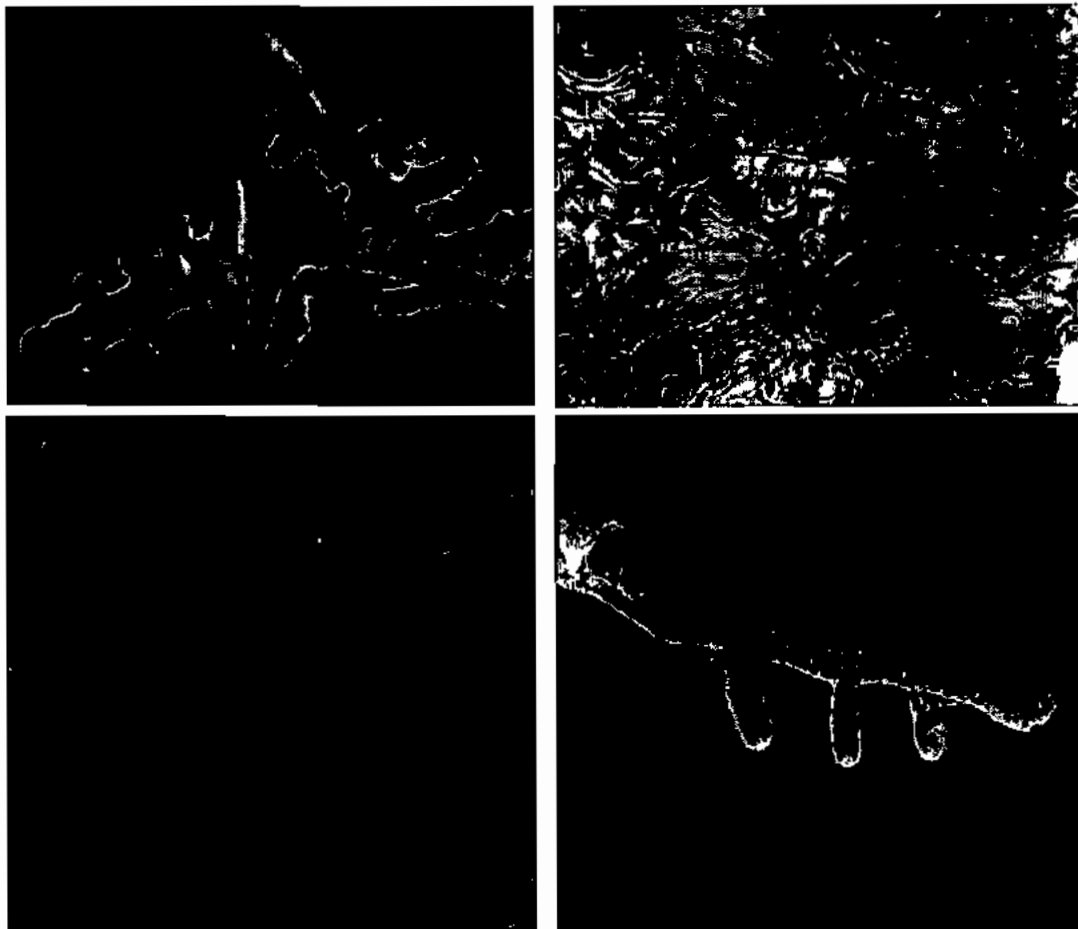


Figure 3. Range of mycorrhizal diagnostics features of *Nothofagus sp.* x *T. melanosporum*

### ***Establishment of experimental plantations***

#### **Site selection**

In order to establishment experimental plantation for truffle cultivation, the soil and climatic conditions of the central southern Chile were studied. For this propose, the ecological requirements for fungi and tree hosts were adjusted. Later, different sites of privates owners were selected in the VII Region. These sites were evaluated in order to determinate their capability for the cultivation.



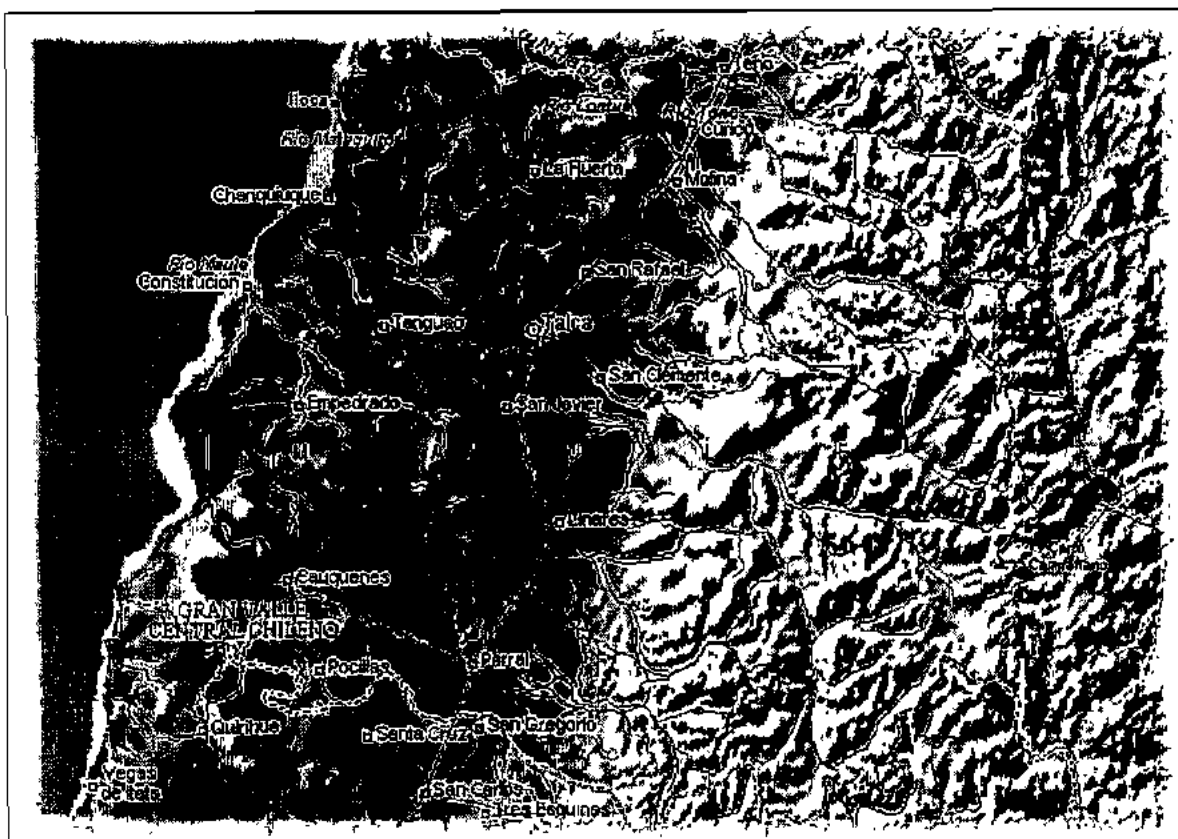


Figure 4. Sites selected for establishment of experimental truffières in the Chilean VII Region

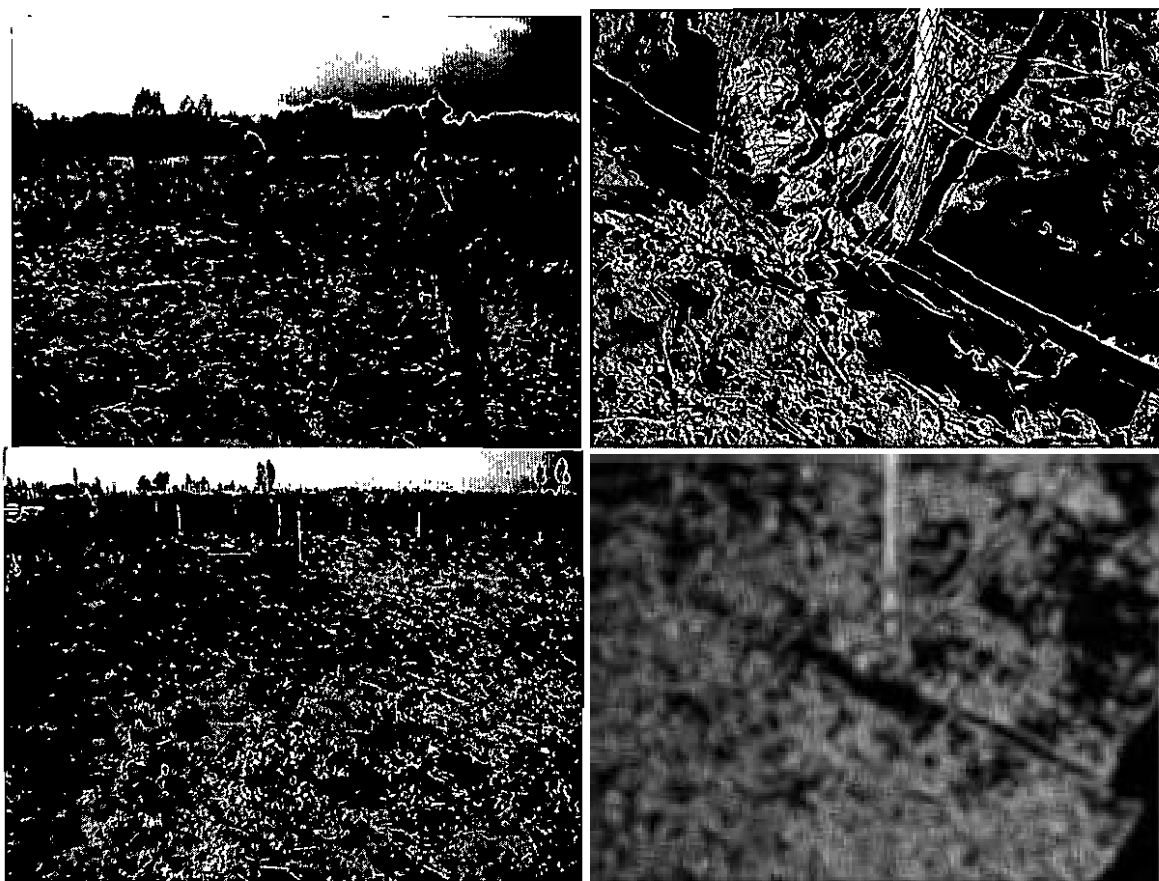
### Site preparation

Soil preparation of the sites for out plantings consisted on plowing, lime application and disc harrowing. Because the selected sites present an inferior pH to the one required (table 5.), it was applied a proportion of approximately 15 tons by hectare of fine lime to increase the pH. According to soil reaction it will continue incorporating mixtures of a fine and coarse lime gradually to stabilize the pH.

Table 5. pH of selected sites

| Zone                            | Location           | Natural pH | Modified pH |
|---------------------------------|--------------------|------------|-------------|
| Los Niches (Andean foothills)   | 35° 05' S latitude | 6.12       | 7.7         |
| San Clemente (Andean foothills) | 35° 35' S latitude | 6.00       | 7.8         |
| Parral (Central Valley)         | 36 ° 8' S latitude | 6.45       | 7.5         |

Currently there are three sites selected under different environmental and cultivation conditions. For each site, soil analysis was one of the main factors on the selection. The first plantations were carried out in November 2003. The sites are located in an experimental station belong to "Universidad Católica del Maule" in "Parral" (36 ° 8' S) and near "San Clemente" (35° 35' S). In the future, trials will generate information and indicators that show the evolution and performance for the first time of the truffle cultivation in Chile.



**Figure 5. Establishment of experimental truffières in the Chilean VII Region**

## ***Discussions***

Chile presents suitable conditions, which could assure us that soil and climate conditions adapted for truffle cultivation can be found in the central southern area, especially where natural precipitation can be supplemented by means of irrigation.

The results obtained in the mycorrhizal analysis indicate that the inoculation techniques have been successful and they allow to address our future works to optimize the cultivation conditions. A good opportunity exists to develop the truffle cultivation in Chile, its adoption in our country and the development of control standards that assure the quality of the production.

## ***Acknowledgments***

The funding for this study is provided by the Foundation for the Agricultural Innovation of the Chilean Government (Grant C01-1-A-085 to Catholic University of Maule).

## References

Astier J. "Truffes blanches et noires", 1998 pp: 68,69 Ed. Louis-Jean

Bencivenga, M., 1999. "Experiencias italianas en truficultura: Problemática, Perspectivas y Expectativas". En "1as Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón". Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.

Cartié, G; Palazón, C.; Delgado, I.; Barriuso, J. 1999. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt, y en la supervivencia de las plantas. En Actes du V Congrès International Science et culture de la Truffe. Aix-en-Provence (France).

Etayo, M.L. y De Miguel, A.M., 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Oloriz (Navarra). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 11: 55-114.

Hall, I.; Brown, G. and Byars, J. 2001". The black truffle: its history, uses and cultivation". New Zealand Ministry of Agriculture & Fisheries. 107 pp. Second Edition.

Rauscher, T.; Agerer, R. and Chevalier, G., 1995. Ektomycorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. Nova Hedwigia 61: 281-322.

Reyna, S.; 1999. Aproximación a una selvicultura trufera . Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. España.

Reyna, S., 2000. Trufa, Truficultura y Selvicultura Trufera. Ediciones Mundiprensa, Madrid 229 pp.

Reyna, S.; Rodríguez Barreal, J.; Folch, L.; Pérez Badia, R.; García, S.; Jiménez, E. 2002. Truffle silviculture in Mediterranean forests. In: Edible mushrooms and their cultivation, Hall, I.; Wan, Y.; Zambonelli, A. and Danell, E. ed. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand 3-6 July 2003. New Zealand Institute For Crop and Food Research Limited, Christchurch.

Riousset, G.; Chevalier, G.; Bardet, M.C. "Truffes d'Europe et de Chine" 2001 pp: 66,67. Ed. Inra editions

Zambonelli A.; Salomoni S.; Pisi A. 1993 Caraterizzazione anatomo-morfologica delle micorrice di *Tuber* ssp. su *Quercus pubescens* Willd. mic. Ital.1993, 3 , 73-90.

## ANEXO 3.2.

Ingrese los datos en los cuadros amarillos

|                                |     |            |
|--------------------------------|-----|------------|
| <b>Valor de Neutralización</b> |     | <b>100</b> |
| CaCO <sub>3</sub>              | 100 |            |
| MgCO <sub>3</sub>              | 119 |            |
| CaO                            | 179 |            |
| MgO                            | 248 |            |

Nota: señale que tipo de producto se utilizara como enmienda

| <b>Eficiencia Relativa</b>          |                     | <b>91,2</b> |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>Análisis Granulométrico</b>      |                     |             |
| Tamaño mm                           | Eficiencia relativa | % retención |
| > 2                                 | 0                   | 0           |
| 0,84-2                              | 0,2                 | 2           |
| 0,3-0,84                            | 0,6                 | 18          |
| <0,3                                | 1                   | 80          |
|                                     |                     | 100         |
| Nota: esto depende de cada producto |                     |             |

**Poder relativo de Neutralización** **91,2**

**Datos Granulométricos**

**Cal Soprocál**

| Tamaño mm | % retención |
|-----------|-------------|
| > 2       | 0           |
| 0,84-2    | 2           |
| 0,3-0,84  | 18          |
| <0,3      | 80          |

**NOTA: Los recuadros en amarillos son los modificables**

|                |          |
|----------------|----------|
| <b>pH Real</b> | <b>6</b> |
|----------------|----------|

|                  |          |
|------------------|----------|
| <b>pH Optimo</b> | <b>8</b> |
|------------------|----------|

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| <b>Capacidad Tampom</b> | <b>0,15</b> |
|-------------------------|-------------|

| Tipo Suelo      | Cap. Tampom |
|-----------------|-------------|
| Nadis           | 0,1         |
| Tumaos          | 0,12        |
| Tradicionales   | 0,15        |
| Rojo Arcillosos | 0,16        |

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| <b>Dosis de Encalado</b> | <b>13,33</b> Ton/ha |
|--------------------------|---------------------|

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Cantidad a Aplicar de Producto</b> | <b>14,62</b> Ton/ha |
|---------------------------------------|---------------------|



ANEXO 4.

# "Introduction and cultivation of *Tuber melanosporum* Vittadini in Chile"

Authors

Ricardo Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Pérez<sup>1</sup>, Santiago Reyna<sup>2</sup> and Rómulo Santelices<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Forestales, Universidad Católica del Maule,  
Avenida San Miguel 3605, Talca, Chile.

<sup>2</sup>Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, Parque Tecnológico,  
C/Charles R. Darwin, 14, E-46980 (Paterna) Valencia, Spain.







**"Introduction and cultivation of  
*Tuber melanosporum* Vittadini in Chile"**

Authors:  
Ricardo Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Pérez<sup>1</sup>, Santiago Reyna<sup>2</sup> and Rómulo Santelices<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Forestales, Universidad Católica del Maule,  
Avenida San Miguel 3605, Talca, Chile.  
<sup>2</sup>Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, Parque Tecnológico,  
C/Charles R. Darwin, 14, E-46980 (Paterna) Valencia, Spain.




## Introduction

- Truffle cultivation until today has been achieved by a limited number of countries in the northern hemisphere:
  - France,
  - Italy
  - Spain

2



## Introduction

- Lately it has been introduced in:
  - United States
  - New Zealand
  - Australia
- Works are also known in:
  - Israel,
  - South Africa
  - Argentina

3



## Introduction

- Truffle cultivation methods are based on the obtaining of mycorrhized plants under greenhouse controlled conditions
- Despite the production of several hundred thousand truffle-infected trees each year, there is a downward trend in production

4



## Introduction

- Experiences in New Zealand and United States, show that truffle production is possible in areas where climate and soils conditions are not ideals

5



## Introduction

- The offer of Chilean edible mycorrhizal mushrooms concentrates on a few species with a relatively low commercial value:
  - *Suillus luteous*
  - *Lactarius deliciosus*

6



## Introduction

- The introduction in Chile of high value ectomycorrhizal fungi offers an excellent opportunity for the creation of new industries and markets

7



## Introduction

- *Tuber melanosporum* is one of the more valued species in international markets
- In some areas of Chile may be ideal for plantations of mycorrhized trees

8



## Chilean Ecological Conditions

CHILE

- Most soils in Chile present a relatively low pH: from 5.5 to 7.0
- In Europe soils commonly present a high pH (7.5 to 8.5)

9



## Chilean Ecological Conditions

CHILE

- There are areas that present calcareous soils (high pH). However, they are located outside areas with suitable climates for truffle introduction (temperature and rainfall)

10



## Chilean Ecological Conditions

CHILE

- Favourable areas to establish truffle plantations can be located in central southern Chile (35° to 40° S latitude)
- Mediterranean Temperate is the predominant climate

11



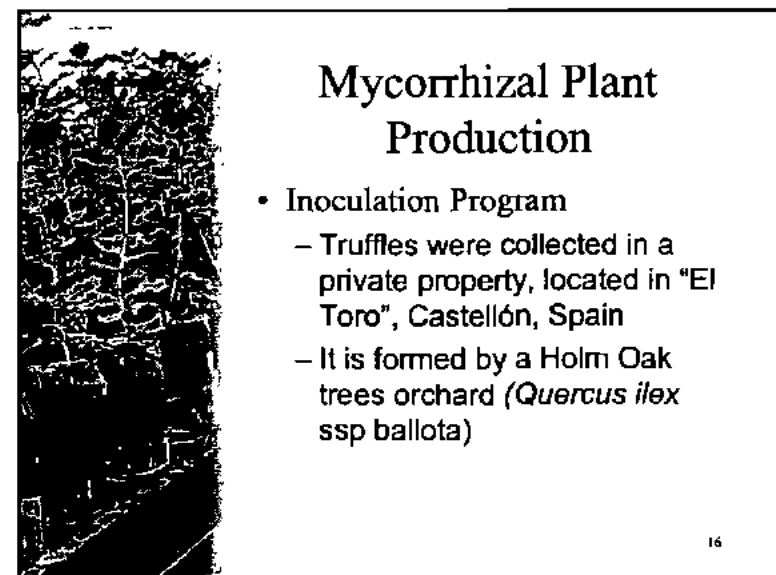
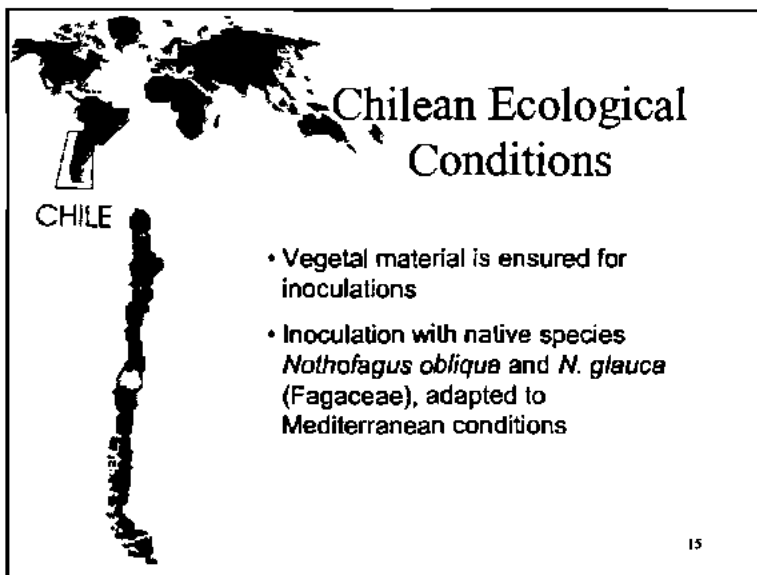
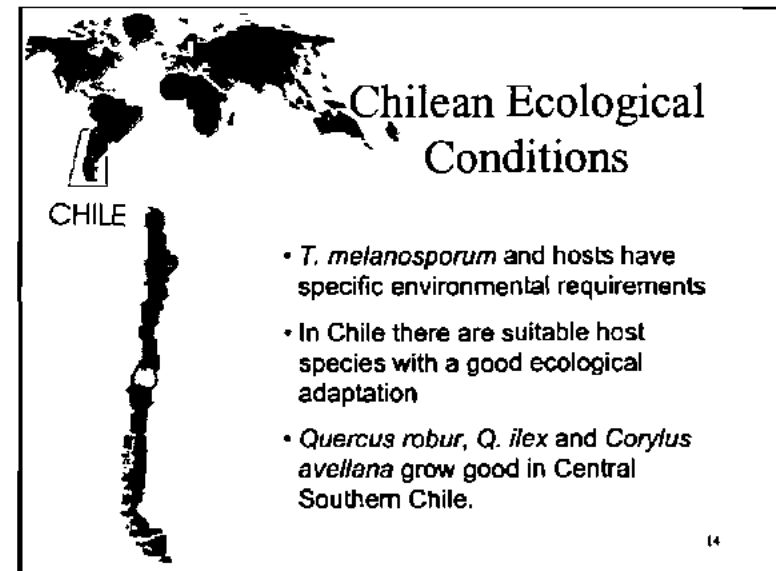
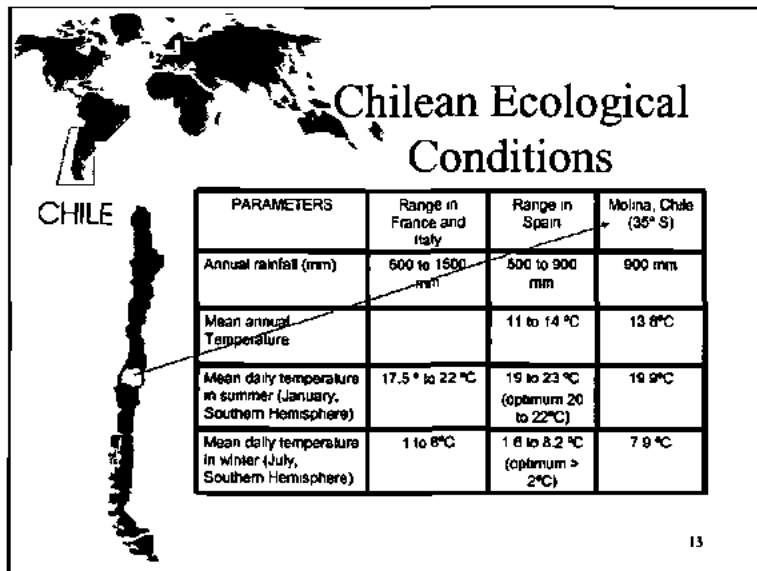
## Chilean Ecological Conditions

CHILE

- There are areas with high pH (high content of calcareous material)
- Irrigation necessities in these areas are higher (Ej. Maipo Valley)

12



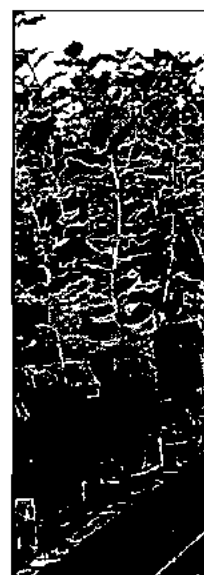




## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - Three kilograms of truffle were collected between 18 to 25 January of 2002
  - 81 ascocarps was obtained, with diameters that oscillated between 2.5 cm to 10.5 cm

17



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Programme
  - In laboratory it carried out their cleaning and disinfections
  - Each ascocarp was carefully brushed and whole earth and small stones stuck were completely removed, then truffles were soaked in 5% sodium hypochlorite during 20 minutes for disinfection

18



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - Truffle inoculation program was carried out by means of a semi-controlled process
  - A tunnel greenhouse was implemented which possesses a ventilation and temperature control system

19



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - An strictly control programme was carried out to achieve hygiene and security conditions that allow a suitable development of the inoculation process

20



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - Seeds of *Quercus ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana*, *Nothofagus obliqua* and *N. glauca* were subjected to a disinfection process by means of 5% sodium hypochlorite
  - After disinfections seeds were sowed in trays under greenhouse conditions

21



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - For *Corylus* seeds, Shells were removed and the disinfection process was the same
  - Seeds were soaked in 100 ppm GA<sub>3</sub> during 24 hours

22



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - In November 2002 seedlings were inoculated by root dunking using sporal inoculum of *T. melanosporum*

23



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - Dried spore inoculum mixed with inert talcum powder as a coadjutant was used
  - All inoculations were made on naked roots. After, seedlings were transplanting to 450 ml and 650 ml Containers

24



## Mycorrhizal Plant Production

- Inoculation Program
  - Seedlings of the native species *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca* were also inoculated

25



## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis
  - After 5-6 months of greenhouse incubation, mycorrhizal analysis was carried out in:
  - Species *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca*,

26



## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis
  - A sample equivalent to 2% volume of each root ball was taken using a cylindrical corer 1.27 cm in diameter and a length equivalent to the width of the container

27



## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis
  - Each root sample free of clay, silt and some of the organic matter was inspected with microscope and the binocular magnifying lens

28

## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis
  - Number of *Tuber* mycorrhiza, non-mycorrhizal tips and contaminated tips were counted for mycorrhizal quantification
  - Definitive mycorrhizal analysis will be conducted in September/October 2003 after ten months of greenhouse incubation

29

## Mycorrhizal Plant Production

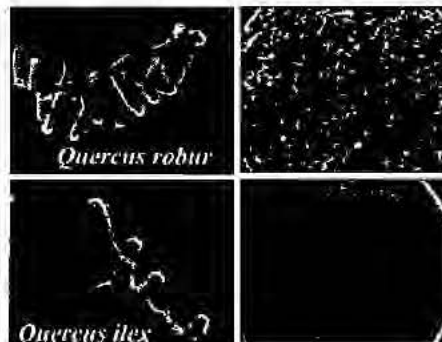
- Mycorrhizal Analysis

| Host                      | Average of mycorrhizal root tips per plant | Standard of infection | Observations                                                                 |
|---------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 2,338                                      | Very good             |                                                                              |
| <i>Quercus robur</i>      | 2,957                                      | Very good             | Some contaminations were presented with <i>Inocybe</i> sp. (non significant) |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 2,672                                      | Very good             |                                                                              |
| <i>Nothofagus glauca</i>  | 107                                        | Low                   |                                                                              |

30

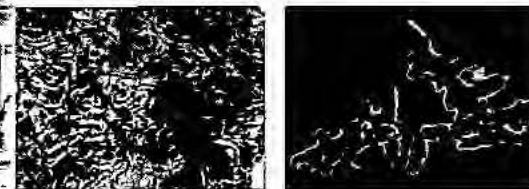
## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis



## Mycorrhizal Plant Production

- Mycorrhizal Analysis



Features of *Nothofagus* x *T. melanosporum* mycorrhiza

32



### Establishment of Experimental Plantations

- Soil and climatic conditions of the Central South Zone of Chile were studied and relation with
- ecological requirements for fungi and tree hosts were adjusted

33



### Establishment of Experimental Plantations

- different sites were evaluated in order to determinate their capability for the cultivation
- Primarily Three sites of privates owners were selected in the Central Zone of Chile

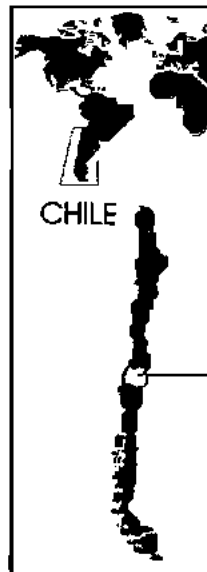
34



### Establishment of Experimental Plantations

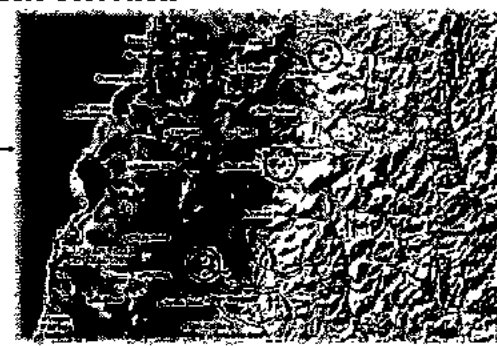
- The selected sites are:
  - “Santa Elisa” (36 ° 8' S)
  - “Maitenes” (35° 35' S)
  - “Los Niches” (35° 05' S)

35



### Establishment of Experimental Plantations

- Site selection





### ***Establishment of Experimental Plantations***

- Site Preparation
  - Soil preparation of the sites for out plantings consisted on plowing, lime application and disc harrowing
  - Selected soils have pH between 6 to 6.5

37



### ***Establishment of Experimental Plantations***

- Site Preparation
  - It was applied a proportion of approximately 15 tons by hectare of fine lime to increase the pH
  - According to soil reaction it will continue incorporating mixtures of a fine and coarse lime gradually to stabilize the pH.

38



### **Discussion and Conclusions**

- Chile presents suitable conditions for truffle cultivation
- Soil and climate conditions of the Central Zone (35 to 40 ° S) could assure the success

39



### **Discussion and Conclusions**

- The inoculation techniques used allow to address our future works to optimize the cultivation conditions
- Results indicate, a good opportunity to develop the truffle cultivation in Chile specially for *Quercus ilex*

40



## Discussion and Conclusions

- The association between *Nothofagus obliqua* and *Tuber melanosporum* opens new perspectives for truffle cultivation research in Chile

41



**Thank you very much**

42



# ANEXO 5.

## INTRODUCCIÓN Y CULTIVO DE *Tuber melanosporum* Vitt. EN CHILE<sup>1</sup>

### Introduction and cultivation of *Tuber melanosporum* Vitt. in Chile

Rómulo Santelices<sup>1\*</sup>, Francisco Pérez<sup>1</sup>, Ricardo Ramírez<sup>1</sup>, Rafael Henríquez<sup>1</sup>, y  
Santiago Reyna<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

We studied the possibility to cultivate *Tuber melanosporum* Vitt. (Black Truffle) in Chile. The climatic conditions of some areas in Chile are very similar to the best truffle producing areas in Europe. These areas are located primarily in the central zone between 33° and 40° S latitude. However, contrary to Europe where soils commonly present a high pH (7.5 to 8.5) most of the appropriate soils in Chile have a pH ranging from 5.5 to 7.0. This discrepancy in pH can be corrected by means of lime application. To investigate the field behaviour and growth of *T. melanosporum* three sites under different environmental conditions were selected where experimental truffières was established. Seedlings of *Quercus ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana*, *Nothofagus obliqua* and *N. glauca* were inoculated using dried spore inoculum of *T. melanosporum* which was mixed with inert talcum powder as a coadjuvant. The programme of inoculation and plant production was conducted under greenhouse conditions. Based on analyses of mycorrhizal morphotypes, the presence of *T. melanosporum* has been confirmed in all species 10 months after inoculation.

#### RESUMEN

Se analiza la posibilidad de introducir en Chile el cultivo de *Tuber melanosporum* Vitt., conocido corrientemente como trufa negra. Para ello se considera que las condiciones climáticas de algunas áreas son muy similares a aquellas de mejor producción en Europa. Estas se concentran entre los 33° y 40° de latitud sur en la zona central. Sin embargo, la mayoría de los suelos apropiados para este cultivo tiene un bajo aporte de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), a diferencia de Europa en donde comúnmente es más alto. Esta diferencia puede ser corregida fácilmente por medio de enmiendas con carbonato de

<sup>1</sup> Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Departamento de Ciencias Forestales, Centro de Investigación en Biotecnología Silvoagropecuaria, Casilla 617, Talca, Chile. E-mail [rsanteli@hualo.ucm.cl](mailto:rsanteli@hualo.ucm.cl).

<sup>2</sup> Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, Parque Tecnológico, C/Charles R. Darwin, 14, E-46980 (Paterna) Valencia, España. E-mail [fundacion@ceam.es](mailto:fundacion@ceam.es).

calcio. Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron y trataron tres diferentes sitios para establecer plantaciones experimentales. Paralelamente, se llevó a cabo un programa de micorrización con plantas de *Quercus ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana*, *Nothofagus obliqua* y *N. glauca* usando como inóculo esporas de *T. melanosporum* deshidratadas y dispersadas en talco inerte como coadyudante. El programa de inoculación se llevó a cabo en un invernadero implementado con todas las condiciones de asepsia para evitar la contaminación con otros hongos de micorriza. Después de 10 meses de efectuada la inoculación, los resultados muestran que la micorrización alcanzó altos niveles en todas plantas, excepto en *N. glauca*.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los hongos micorrícicos de mayor valor comercial en el mundo es *Tuber melanosporum* Vitt., llegando a alcanzar precios superiores a los US\$ 700 por kilo fresco. Sin embargo, su cultivo se ha logrado en un número limitado de países en el Hemisferio Norte (Reyna, 2000), aunque en el último tiempo ha sido introducido en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, países que están comenzando recién a producir (Hall *et al.*, 2001). También se han reportado trabajos en Israel, Sudáfrica y Argentina (Reyna, 2000; Reyna *et al.*, 2002).

Hoy en día, los métodos de producción se basan en la obtención de plantas micorrizadas bajo condiciones controladas de invernadero, con técnicas que son incluso mantenidas como secreto comercial. A pesar de que se producen muchos cientos de miles de plantas inoculadas cada año y que se establecen extensas áreas para el cultivo de trufa, no ha sido posible detener la tendencia a la baja que hoy se da en la producción de trufas (Reyna, 2000). La razón de ello podría encontrarse en la competencia ejercida por otros hongos nativos micorrícicos, ya sea en la etapa de invernadero o posteriormente en la plantación.

En la actualidad, han sido establecidas truffières en Nueva Zelanda y Estados Unidos, lo que muestra que es posible el cultivo fuera del área de distribución natural en donde las condiciones de clima y suelo no son las ideales (Hall *et al.*, 2001).

La oferta de hongos micorrícicos en Chile se concentra en unas pocas especies. Se destacan *Suillus luteous* (Fries) S.F. Gray y *Lactarius deliciosus* (L.: Fr.) S.F. Gray, los que han sido introducidos accidentalmente al país y tienen un relativo bajo valor comercial. En consecuencia, es atractiva la introducción de hongos de mayor valor comercial, especialmente aquellos que se podrían comercializar contra temporada. En este contexto, *T. melanosporum* aparece como una alternativa comercial interesante, pero para ello deben estudiarse variados factores tanto en la primera etapa de inoculación en invernadero, como posteriormente en el establecimiento de las truffières.

El propósito de este estudio es comparar las condiciones agroclimáticas de la zona central de Chile con las del área de distribución natural de *T. melanosporum* para llegar a seleccionar sitios para el establecimiento de plantaciones y, además, analizar el proceso de inoculación bajo condiciones controladas de invernadero.

## MATERIAL Y MÉTODO

Mediante revisión bibliográfica se recopilaron antecedentes relacionados con el cultivo de *T. melanosporum* en su área de distribución natural y fuera de ella. Estos fueron comparados con las condiciones agroecológicas de la zona central de Chile, de tal forma de tener parámetros para la selección de sitios para ensayos y para el programa de inoculación.

### Condiciones agroecológicas para el cultivo de *Tuber melanosporum* en Chile

Los suelos donde la especie se distribuye en Europa en forma natural son de origen calcáreo y tienen un pH alto (7,5 a 8,5). En cambio en Chile, en aquellas áreas donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del hongo, la mayoría presenta un pH relativamente bajo (5,5 a 6,5). Existen suelos con pH más altos, aquellos de origen calcáreo, ubicados en la zona norte del país donde los niveles de precipitación y temperatura no son adecuados para este cultivo.

La presencia de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en el suelo es un factor decisivo en el cultivo de trufa negra (Reyna, 2000).

Las áreas más favorables para establecer plantaciones con trufas se encuentran entre la Región del Maule y la Región de los Lagos (35° a 40° latitud sur), en donde el clima predominante es el mediterráneo templado (Cuadro 1). Sin embargo, estos suelos tienen un pH levemente ácido, lo que no es adecuado para el cultivo de trufas, razón por la cual es necesario realizar enmiendas con  $\text{CaCO}_3$  para corregirlo. Por otra parte, es necesario destacar que para cultivar trufas los suelos no deben ser excesivamente fértiles, básicamente para favorecer la asociación entre el hongo y la planta. En consecuencia, existe una amplia gama de suelos susceptibles de ser aprovechados para este efecto, incluso en sectores marginales, sin ejercer competencia para aquellos destinados a un cultivo intensivo.

Como se ha mencionado, *T. melanosporum* tiene requerimientos ambientales específicos, al igual que los árboles huésped por lo que su selección también es un factor que puede llegar a ser crítico. En este sentido, es necesario señalar que en Chile se han introducido varias de estas especies, todas originarias

de Europa, adaptándose bien a las condiciones locales y se puede afirmar que se encuentran ya asilvestradas. Esto permite asegurar el material vegetal para la inoculación.

### **Producción y análisis de plantas micorrizadas**

La obtención de inóculo de alta calidad es indispensable y el primer paso para tener éxito en el programa de inoculación. Para este efecto se consideró coleccionar el material en el tiempo apropiado, asegurando que las trufas tuvieran buena maduración. Además, se consideró la identificación del material, ya que es común en Europa la confusión con otras trufas como *T. brumale*, de inferior calidad y precio. Las trufas fueron cosechadas en enero de 2002 de una antigua plantación de *Q. ilex* en una propiedad privada en Castellón, España. Posteriormente, en laboratorio fueron prolijamente limpiadas y desinfectadas.

La inoculación se efectuó bajo condiciones controladas en un invernadero recubierto con plástico e implementado con sistemas de ventilación y control de temperatura. Se consideraron estrictas medidas de seguridad con el objeto de disminuir el riesgo de contaminación con otros hongos. El proceso de inoculación se llevó a cabo en noviembre de 2002 con plantas *Q. ilex*, *Q. robur*, *C. avellana*, *N. glauca* y *N. obliqua* preparadas especialmente para ello en el invernadero. La inoculación se realizó siguiendo el método de Cartié *et al.* (1999), aplicando directamente a las raíces de las plantas el inóculo deshidratado y dispersado en talco.

Transcurridos cinco meses de efectuada la inoculación se procedió a realizar el análisis de micorrización, siguiendo la técnica desarrollada por Reyna (1999). Se tomó una muestra de 7 cc, equivalente al 2% del volumen de cada raíz. Las muestras fueron limpiadas cuidadosamente y luego fueron analizadas bajo lupa y microscopio. La información obtenida fue contrastada con los trabajos de Zambonelli *et al.* (1993), Rauscher *et al.* (1995), Etayo y de Miguel (1998) y Reyna (1999).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Selección de sitios para plantaciones experimentales**

Después de un riguroso análisis de las características agroecológicas de diferentes predios en la zona central de Chile, se procedió a seleccionar tres unidades (Cuadro 2).

Para el aporte de  $\text{CaCO}_3$ , y por ende el pH, se efectuó una enmienda calcárea, aplicando en promedio 15 ton de  $\text{CaCO}_3$  de granulometría fina por hectárea. Para ello se efectuó una aradura del suelo con

arado de disco y posteriormente la aplicación. De acuerdo a la reacción posterior del suelo, se seguirá aplicando al suelo gradualmente una mezcla de  $\text{CaCO}_3$  de granulometría fina y gruesa.

### **Análisis de micorrización**

Después de 10 meses de incubación se efectuó el análisis de micorrización observándose excelentes resultados (Cuadro 3).

Para las especies con las que se asocia *T. melanosporum* en su área de distribución natural los resultados obtenidos aseguran superar con éxito una de las fases críticas para establecer el cultivo de trufas en Chile, es decir, la producción de plantas infectadas. En términos relativos, se obtuvo un grado de micorrización superior al 40%. Por otra parte, el estándar de infección logrado con *N. obliqua* abre una nueva perspectiva de investigación en relación al cultivo de este hongo.

## **CONCLUSIONES**

En la zona central de Chile las condiciones climáticas y de suelo son similares a las del área de distribución natural de *T. melanosporum*, lo que permite estimar que su cultivo es factible. Sin embargo, es fundamental corregir los aportes de  $\text{CaCO}_3$ , lo que fácilmente se logra con enmiendas de  $\text{CaCO}_3$ . También debe considerarse la implementación de un sistema de riego a fin de suplementar el déficit de precipitación en ese periodo.

Existen dos tiempos críticos para desarrollar con éxito las plantaciones de trufa. El primero de ellos es durante la fase de inoculación y el segundo corresponde al establecimiento de las plantas infectadas con el hongo en terreno. La inoculación se puede lograr con éxito al manejar con rigurosidad las condiciones de asepsia en el invernadero.

## **LITERATURA CITADA**

- Cartié, G., Palazón, C., Delgado, I.; Barriuso, J. 1999. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt, y en la supervivencia de las plantas. En: Actes du V Congrès International Science et culture de la Truffe. Aix-en-Provence (France).
- Etayo, M.L., y De Miguel, A.M. 1998. Estudio de las ectomicorrizas en una trufiera cultivada situada en Oloriz (Navarra). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica Nº 11: 55-114.

- Hall, I., Brown, G., and Byars, J. 2001. The black truffle: its history, uses and cultivation. New Zealand Ministry of Agriculture & Fisheries. Second Edition. 107 pp.
- Rauscher, T., Agerer, R., and Chevalier, G. 1995. Ektomycorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. Nova Hedwigia 61: 281-322.
- Reyna, S. 1999. Aproximación a una selvicultura trufera. Tesis Doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Reyna, S. 2000. Trufa, Truficultura y Selvicultura Trufera. Ediciones Mundiprensa, Madrid. 229 pp.
- Reyna, S., Rodríguez Barreal, J.; Folch, L.; Pérez Badia, R.; García, S.; Jiménez, E. 2002. Truffle silviculture in Mediterranean forests. In: Edible mushrooms and their cultivation, Hall, I.; Wan, Y.; Zambonelli, A. and Danell, E. Ed. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand. New Zealand Institute For Crop and Food Research Limited, Christchurch.
- Zambonelli, A., Salomoni S., Pisi A. 1993. Caraterizzazione anatomo-morfologica delle micorrice di *Tuber* ssp. su *Quercus pubescens* Willd. Micologia Italiana N°3: 73-90.

Cuadro 1: Comparación de algunos parámetros climáticos de áreas trufieras en Europa con una de la zona mediterránea de Chile.

Table 1. Comparisons of some climate parameters of European truffières areas with a typical Mediterranean area of Chile.

| Parámetro                            | Europa           |              | Chile          |
|--------------------------------------|------------------|--------------|----------------|
|                                      | Francia e Italia | España       | Molina (35° S) |
| Precipitación anual                  | 600 a 1500 mm    | 500 a 900 mm | 900 mm         |
| Temperatura media anual              | -                | 11 a 14°C    | 13,8°C         |
| Temperatura media diaria en verano   | 17,5 a 22°C      | 19 a 23°C    | 19,9°C         |
| Temperatura media diaria en invierno | 1 a 8°C          | 1,6 a 8,2°C  | 7,9 °C         |

Fuente: Reyna (2000) y Hall (2001).

Cuadro 2: Ubicación y pH de los sitios seleccionados para plantaciones experimentales en la Región del Maule de Chile.

Table 2: Location and pH of the selected sites for establishment experimental truffères in the Maule Region of Chile.

| Zona de referencia                 | Ubicación geográfica | pH     |           |
|------------------------------------|----------------------|--------|-----------|
|                                    |                      | Normal | Corregido |
| Curicó (precordilera andina)       | 35° 05' latitud sur  | 6,12   | 7,5       |
| San Clemente (precordilera andina) | 35° 35' latitud sur  | 6,00   | 7,8       |
| Parral (Valle Central)             | 36° 08' latitud sur  | 6,45   | 7,5       |



Cuadro 3: Análisis de micorrización.

Table 3: Mycorrhizal analysis.

| Huésped                   | Promedio de raíces micorrizadas por<br>planta | Estándar de infección |
|---------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 6.325                                         | Excelente             |
| <i>Quercus robur</i>      | 4.300                                         | Excelente *           |
| <i>Corylus avellana</i>   | 6.025                                         | Excelente             |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 107                                           | Bajo                  |
| <i>Nothofagus glauca</i>  | 2.656                                         | Muy bueno             |

\* Se encontró algo de contaminación con *Inocybe* sp.

## Cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) en Chile. Una alternativa productiva sustentable bajo un sistema de manejo agro silvícola\*

RICARDO RAMÍREZ C.<sup>1</sup>, SANTIAGO REYNA D.<sup>2</sup>, RÓMULO SANTELICES M.<sup>1</sup>, GOETZ PALFNER<sup>3</sup>, SERGI GARCÍA B<sup>2</sup>, RAFAEL HENRÍQUEZ CH.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. Ciencias Forestales, Universidad Católica del Maule. Avenida San Miguel 3605, Talca, Chile. e-mail: proyecto@hualo.ucm.cl <sup>2</sup>Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. Parque Tecnológico, C/Charles R. Darwin, 14, E-46980 (Paterna) Valencia, España. e-mail: santiago@ceam.es

<sup>3</sup>Depto. Ciencias Químicas, Universidad de la Frontera. Avenida Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile. e-mail: gpalfner@ufro.cl

### SUMMARY

Chile presents a clear potential for truffle cultivation, since, due to the ecological conditions and geographical situation, mycorrhizal fungi that can compete with new introduced species are barely represented in large areas of the country, mainly in soils used by the traditional agriculture and the cattle raising. Of these mushrooms, the black truffle (*Tuber melanosporum*, Vittad.) command very high prices in the international markets and also, it is one of the few ectomycorrhizal fungi that has been able to cultivate artificially with more grade of success in established plantations (Truffières). The first step critic to develop the cultivation in Chile is the capacity to establish the plant-fungi symbiosis under artificial way. For this, recently the first mycorrhized plants whit *T. melanosporum* have been obtained under greenhouse controlled conditions. In November 2002, seedlings of *Quercus ilex*, *Q. robur* and *Corylus avellana* were inoculated using dried spore inoculum of *T. melanosporum* imported from "Castellón" Spain. Seedlings were produced in a greenhouse using local seed provenances which provide eco-types best adapted to the study area. Seedlings of the native species *Nothofagus obliqua* and *Nothofagus glauca* have also been inoculated with the purpose of evaluating their aptitude to *Tuber* mycorrhization. To investigate the field growth and adaptation of *Tuber melanosporum*, several agricultural sites under different environmental conditions have been selected in the VII Region, where recently the first experimental plantations for truffle cultivation in Chile have been settled down. The present work aims to show the technical and experimental advances carried out between the years 2002 to 2004, also the analysis and discussion of the results obtained in the *T. melanosporum* mycorrhization and initial adaptation to the field growth conditions.

Keywords: Truffle, *Tuber melanosporum*, Cultivation, Chile.

### RESUMEN

Chile presenta un claro potencial para el cultivo de trufas, ya que, por las condiciones ecológicas y situación geográfica, los hongos ectomicorrícicos que puedan competir con nuevas especies introducidas están escasamente representados en grandes áreas del país, principalmente en suelos utilizados por la agricultura tradicional y la ganadería. Dentro de estos hongos, la trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vittad.) alcanza altos precios en el mercado internacional y además, es uno de los pocos hongos de ectomicorriza que ha podido cultivarse con mayor grado de éxito en plantaciones

\* Este trabajo ha sido apoyado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) a través del proyecto C01-1-A-085.

establecidas artificialmente (Truffières). El primer paso crítico para desarrollar el cultivo en Chile es la capacidad de establecer la simbiosis planta/hongo en forma artificial, para lo cual, recientemente se han obtenido las primeras producciones de planta micorrizada con *T. melanosporum*, bajo condiciones controladas en invernadero. En noviembre del 2002, se inocularon plantas de las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Corylus avellana*, a partir de inóculo esporal de *T. melanosporum*, importado desde “Castellón”, España. Las plantas fueron propagadas en invernadero utilizando semillas de procedencia local, lo que proporciona eco-tipos mejor adaptados al área de estudio. También se han inoculado las especies nativas *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus glauca*, con el propósito de evaluar su aptitud para la micorrización con *T. melanosporum*. Para investigar el desarrollo y adaptación de *T. melanosporum* en campo, se han seleccionado varios sitios agrícolas, bajo diferentes condiciones ambientales de la VII Región, donde recientemente se han establecido las primeras plantaciones experimentales para el cultivo de trufas en Chile. El presente trabajo pretende mostrar los avances técnicos y experimentales llevados a cabo entre los años 2002 a 2004, además el análisis y discusión de los resultados obtenidos en la micorrización con *T. melanosporum* y la adaptación inicial del hongo a las condiciones de crecimiento en campo.

Palabras clave: Trufa, *Tuber melanosporum*, Cultivo, Chile

## INTRODUCCIÓN

Las trufas (*Tuber* sp.) son los cuerpos reproductivos de varias especies de hongos ascomicetos y cumplen la función de producción y dispersión de esporas sexuales. A diferencia de las setas o callampas comunes (*Suillus* spp., *Boletus* spp. y *Lactarius deliciosus*), que dependen del viento para dispersar sus esporas, las trufas crecen bajo el suelo (hipógeas) y dependen fuertemente de animales que las consuman para así dispersar las esporas a través de sus heces. Consecuentemente, estos hongos han desarrollado estructuras reproductivas que emiten fuertes aromas y de esta manera atraen a los animales que las detectan y consumen (10).

Todas las trufas (*Tuber* sp.) forman una asociación simbiótica con algunas especies de árboles hospederos. Esta asociación, llamada ectomicorriza, considera el envolvimiento de las raíces finas del árbol, por el hongo, formando una especie de manto que cubre estas raíces. A partir del manto, nacen hifas que penetran en los espacios intercelulares de la raíz y a la vez, otras hifas emanan fuera del sistema radical, formando un micelio que cumple la función de exploración del suelo, aumentando por ende la superficie de absorción del sistema radical del árbol.

El cultivo de la trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) hasta hoy ha sido logrado por pocos países en el hemisferio norte (Francia, Italia, España). (14). Durante los últimos diez años ha sido introducido en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia, donde su producción está comenzando recientemente (8). Además se conocen trabajos en Israel y Sudáfrica. (14).

Actualmente, las técnicas de cultivo de *T. melanosporum* se basan en primer lugar en la obtención de plantas micorrizadas con el hongo en forma controlada, cuyos mayores avances se han logrado en Europa y recientemente en Nueva Zelanda y Estados Unidos, sin embargo, estas técnicas son celosamente protegidas como secretos comerciales. Aunque el desarrollo de estas técnicas, ha incentivado el establecimiento de varios miles de hectáreas de plantaciones trufas en Europa, no se ha logrado compensar la drástica caída de la producción silvestre (15). Esta situación se debe a que las mismas plantas cultivadas con distintos métodos y en diferentes ambientes, pueden comportarse en

forma diametralmente opuesta. Por otro lado, la competencia de hongos ectomicorrícicos nativos, ya sea durante los procesos de micorización en vivero, como también el posterior cultivo en campo, ha generado rendimientos variables en las plantaciones europeas (2).

El primer paso crítico para desarrollar el cultivo de *T. melanosporum* en Chile, es la implementación de un proceso efectivo de producción de plantas micorizadas con el hongo en forma controlada. Este aspecto es de vital importancia, ya que, según las experiencias europeas la entrada en producción de una plantación podría tardar entre 6 a 10 años. Por esta razón se debe asegurar la calidad en el proceso de micorización en vivero, donde pueden ocurrir contaminaciones con hongos sin interés comercial, que podrían afectar el resultado final (14); (10); (5).

La ubicación geográfica y características agroclimáticas de nuestro país, generan condiciones donde los hongos ectomicorrícicos que puedan competir con nuevas especies introducidas están escasamente representados, principalmente en algunas áreas de la zona centro sur que presentan suelos de uso agrícola y ganadero. Esta condición, representa además una ventaja comercial al permitir generar una oferta de trufa fresca, durante el período contra temporada de los mercados del hemisferio norte, opción que ofrece grandes perspectivas para el desarrollo de este cultivo como una nueva alternativa de diversificación agroforestal para el sector silvoagropecuario.

El presente trabajo es parte de un proyecto piloto desarrollado por la Universidad Católica del Maule en conjunto con la Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo (CEAM), España y es impulsado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) de Chile. En una primera etapa de este proyecto se evaluó la factibilidad técnica para introducir y desarrollar el cultivo de *T. melanosporum*, mediante el estudio de los principales factores agroclimáticos que determinan las posibilidades de cultivo en nuestro país. Paralelamente, se implementó un sistema de producción de plantas micorizadas, mediante el desarrollo de un proceso de inoculación operado bajo condiciones controladas en invernadero. A partir de este proceso se han obtenido las primeras producciones de plantas micorizadas con *T. melanosporum*, mediante las cuales se implementará una red de plantaciones experimentales con el objetivo de desarrollar esta alternativa de cultivo en nuestro país.

Los resultados de seguimiento de las plantaciones permitirán obtener indicadores que reflejen la evolución y comportamiento del cultivo hasta el inicio de la producción en Chile.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Producción de plantas micorizadas con trufa negra**

Las trufas utilizadas para la preparación del inóculo fueron colectadas en una plantación productiva ubicada en el municipio de "El Toro", Castellón, España. Esta plantación tiene una edad aproximada de 30 años y está formada por encinas (*Quercus ilex* ssp *ballota*) inoculadas con el hongo *T. melanosporum*. El área donde se ubica esta plantación se inserta en una zona de clima mediterráneo continental, característico del Sur Este de España. El suelo es de textura Franca, con pedregosidad superficial, el cual presenta un subsuelo con roca madre caliza, característico de estas zonas de España.

Una vez colectadas las trufas, se procedió a realizar su limpieza y desinfección, para ello se cepilló cada uno de los carpóforos cuidadosamente hasta eliminar por completo toda la tierra y piedras pequeñas adheridas al peridio (cubierta). Tras ello se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5%, mediante un remojo por 20 minutos.

Posterior a la limpieza y desinfección se prepararon muestras de cada trufa, sobre porta-objetos, de una pequeña porción de la gleba para confirmar la especie por medio de visualización de las esporas (Figura 1). Estas preparaciones se analizaron mediante microscopio compuesto a 400x y 630x identificando las esporas de *T. melanosporum* con la ayuda de bibliografía especializada y claves taxonómicas.



Figura 1. Ascas y esporas de *T. melanosporum* observadas bajo microscopio compuesto (400X)

Las características de las esporas de *T. melanosporum* coincidieron plenamente con las expuestas en la bibliografía especializada (1); (16); (14). (Tabla 1.)

Tabla 1. Características de esporas y ascas

| Parámetro                         | Observación                                |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| Tipo de las ascas                 | globosas, pedunculadas                     |
| Tamaño del eje menor del asca     | 80-120 $\mu$                               |
| Tamaño del eje mayor del asca     | 90-140 $\mu$                               |
| Número de esporas por asca        | entre 1 y 6                                |
| Tamaño del eje mayor de la espora | 29-35 $\mu$                                |
| Tamaño del eje menor de la espora | 20-26 $\mu$                                |
| Forma de la espora                | elíptica                                   |
| Ornamentación de esporas          | Con espínulas (cistidios) cortas y rígidas |
| Color de las esporas              | Café oscuro                                |

El programa de inoculación y cultivo de plantas fue llevado a cabo mediante un proceso semi-controlado en condiciones de invernadero. Se implementó un invernadero tipo túnel equipado con sistemas de control automático de temperatura, ventilación y riego.

El invernadero se encuentra ubicado en Talca, en instalaciones de la Universidad Católica del Maule. Como medida de higiene, se instaló una antecámara para desinfección a la entrada del invernadero y el piso de este fue cubierto por una malla de polipropileno entretejida (Covertex®). Además el agua de riego es controlada estrictamente mediante desinfección con cloro y posteriormente dejando reposar en un estanque abierto, previo a su uso en el sistema de riego.

Todos los controles tienen el objetivo de lograr condiciones de higiene y seguridad que permitan un desarrollo adecuado del proceso de inoculación, disminuyendo los riesgos de contaminaciones con otros hongos de ectomicorriza que pueden competir con *T. melanosporum* dentro del ambiente de invernadero.

El material vegetal usado en la inoculación fue propagado mediante semillas. Para esto se utilizó semillas de las especies *Quercus ilex*, *Quercus robur*, *Corylus avellana*, *Nothofagus obliqua* and *N. glauca*, de procedencia nacional. Todas las semillas fueron esterilizadas superficialmente, mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos. Posteriormente, estas fueron lavadas con tres cambios de agua corriente y se sembraron directamente en bandejas dentro del invernadero utilizando un sustrato compuesto de una mezcla perlita/vermiculita en proporción 1:1.

La inoculación se realizó en noviembre de 2002, después de 4 a 5 meses desde la siembra. El método de inoculación empleado, se basó en trabajos desarrollados por Cartié *et al.* (4), incluyendo adaptaciones con respecto al sustrato, contenedores y concentración del inóculo de trufa.

Las plantas fueron extraídas del sustrato de siembra y se inocularon inmediatamente, mediante espolvoreo a raíz desnuda, aplicando el inóculo de trufa mediante el uso de un salero de luz mediana. El inóculo utilizado esta basado en una mezcla de trufa seca, molida en forma controlada para producir la ruptura de las ascas, el cual se mezcló con talco inerte como coadyuvante en una proporción 1:4, donde 1 g de inóculo equivale aproximadamente a 1g. de trufa fresca. Posteriormente las plantas inoculadas se transplantaron en contenedores de 450 ml y 650 ml, utilizando un sustrato que fue previamente desinfectado, donde se produce la incubación de la simbiosis. La desinfección del sustrato se realizó mediante vaporizado durante 2 horas. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de suelo, vermiculita, perlita y turba, cuyas características se detallan en la Tabla 2. El suelo utilizado en la mezcla es un mollisol aluvial calcáreo que fue extraído de una parcela de uso agrícola ubicada en un sector aledaño a Calera de Tango, Región Metropolitana.

Tabla 2. Características de sustratos de transplante

| Componente     | Proporción v/v | pH   |
|----------------|----------------|------|
| Suelo calcáreo | 49%            | 8,18 |
| Vermiculita    | 11%            | 7,5  |
| Perlita        | 25%            | 7,0  |
| Turba          | 15%            | 6,0  |

Con el objetivo de lograr las condiciones de pH del medio de cultivo, requeridas por *T. melanosporum*, se agregó a la mezcla de los componentes una enmienda con cal fina y cal gruesa a razones de 1,5 % p/p y 5% v/v respectivamente.

Análisis de micorrizas en plantas inoculadas con *T. melanosporum* en invernadero

Para el muestreo y análisis de la micorrización se utilizó una metodología propuesta por Reyna, (13) para *Quercus ilex*, que se basa en un muestreo no destructivo. Las muestras fueron colectadas de los cepellones de la plantas inoculadas después de 10 meses de incubación en invernadero.

Se tomó una muestra de 18 plantas por especie, seleccionadas en forma aleatoria en cada lote de producción. Los lotes de producción son separados según las diferentes especies simbiontes inoculadas.

Posteriormente se realizó un muestreo en volumen de los cepellones, de la siguiente forma: Del cepellón de cada planta, cultivada en contenedor, se extrajo con un sacabocados una muestra cilíndrica de 1,27 cm de diámetro en la zona media del contenedor y una longitud equivalente a la anchura del contenedor a esa altura, esto supone un volumen muestreado del orden de 7 cc., equivalente, aproximadamente, a un 2% del volumen del contenedor. La muestra cilíndrica se extrajo en sentido horizontal. Para ello se sacó la planta del envase y se ubicó en otro en el que se ha realizado previamente una perforación a media altura, luego se introduce el sacabocados imprimiendo una rotación constante para provocar el corte de las raíces y evitar su rotura (Figura 2).

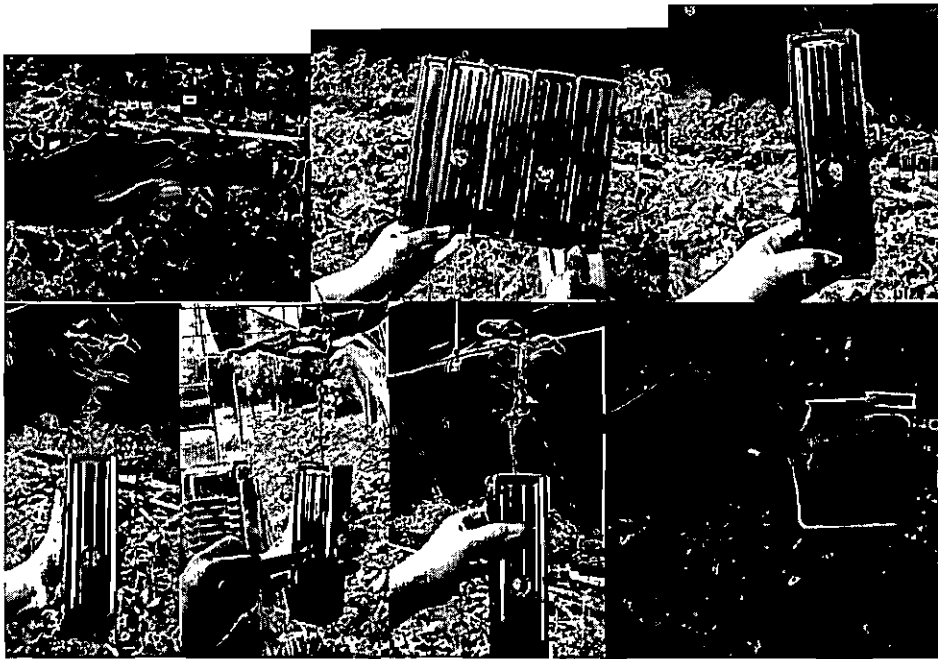


Figura 2. Muestreo de raíces micorrizadas

Ya extraídas las muestras se procesaron en laboratorio para su análisis. Este proceso consistió en eliminar las partículas de sustrato adheridas a las raicillas. Se realizaron varias decantaciones sucesivas incorporando agua destilada más un surfactante (Tween 80), con ello se logra la eliminación de los restos de sustrato y suciedad.

El producto se capturó sobre un tamiz de 1 mm y se volvió a lavar por inmersión en un vaso de precipitados. El producto decantado en el fondo del vaso se observó nuevamente con el fin de comprobar que no se han perdido ápices micorrizados; la muestra ya procesada se deposita en una placa petri con agua destilada y se analiza mediante lupa binocular, contándose todas las micorrizas de *T. melanosporum*, ápices sin micorrizar y micorrizas contaminantes.

Cuando se presentaron dudas sobre el reconocimiento de alguna micorriza se comprobó al microscopio las características morfoanatómicas de la especie, confirmando que se trata de micorrizas de *T. melanosporum* (Figura 3.). La información obtenida en los análisis microscópicos fué contrastada con trabajos publicados en bibliografía especializada (17); (12); (6); (13).



Figura 3. Rango de características de diagnóstico usadas para la identificación de ectomicorrizas de *T. melanosporum*

Para cuantificar los niveles de micorrización, se contabilizó el número de micorrizas de *T. melanosporum*, ápices no micorrizados y contaminaciones con otras micorrizas. Todas las referencias se calcularon en relación al volumen de la muestra para luego extrapolarlo al volumen del contenedor.

A partir de estos análisis, se definen los grados de calidad para la planta micorrizada, los cuales se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Criterios de calidad de micorrización aplicados para *T. melanosporum*

| Nº promedio de micorrizas de <i>T. melanosporum</i> por planta | Calidad de la micorrización |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1-100                                                          | Insuficiente                |
| 101 -250                                                       | Escasa                      |
| 251-500                                                        | Aceptable                   |
| 501- 1500                                                      | Buena                       |
| 1500-3000                                                      | Muy buena                   |
| > 3000                                                         | Excelente                   |

#### Establecimiento de plantaciones

Con el objetivo de establecer las primeras plantaciones demostrativas para el cultivo de trufa negra en Chile, se seleccionaron 3 sitios bajo diferentes condiciones ambientales de la séptima región. Estos sitios fueron seleccionados en base a la evaluación de parámetros físico-químicos de suelo y además de exposición, pendiente e historial de cultivos. Esta información fue analizada y contrastada con los requerimientos de suelo para la trufa.

Los sitios seleccionados encuentran ubicados en Chequenlemu (35° 05' S), Maitenes (San Clemente, 35° 35' S) y Parral (36 ° 8'). (Tabla 4).



Tabla 4. Sitios seleccionados para el establecimiento de plantaciones

| Ubicación                               | Coordenadas | pH natural inicial | pH modificado |
|-----------------------------------------|-------------|--------------------|---------------|
| Chequenlemu, Los Niches (Precordillera) | 35° 05' S   | 6.12               | 7.5           |
| Maitenes, San Clemente (Precordillera)  | 35° 35' S   | 6.00               | 7.8           |
| Parral (Valle central)                  | 36 ° 8' S   | 6.45               | 7.5           |

La preparación de suelo previo a las plantaciones consistió en la rotura del perfil con arado de vertedera, luego se aplicó cal agrícola y posteriormente se incorporó esta con arado de discos a una profundidad de 20 cm. Debido a que los sitios seleccionados para el establecimiento, presentan un pH natural menor al requerido por *T. melanosporum*, se aplicaron enmiendas correctivas iniciales en proporciones de entre 15 a 20 toneladas por hectárea de cal agrícola (Carbonato de calcio).

Según la evolución del pH del suelo se continuará incorporando gradualmente mezclas de cal fina y gruesa como encalado de mantención para estabilizar el pH a niveles óptimos.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte y equidistantes entre hileras a 6m. En cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie (Tabla 5).

Tabla 5. Marcos de plantación utilizados según especie

| Especie                   | Espaciamiento en la hilera | Espaciamiento entre hileras |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 6                          | 6                           |
| <i>Quercus robur</i>      | 7                          | 6                           |
| <i>Coryllus avellana</i>  | 4                          | 6                           |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 7                          | 6                           |

El marco de plantación se estableció en tres bolillo, con el propósito de optimizar el espacio disponible para las plantas. La plantación de las unidades demostrativas se dividió en bloques de plantación por especie, los cuales fueron distribuidos de acuerdo a las características topográficas de la parcela, disponibilidad de plantas por especie y optimización de la superficie disponible.

Para el establecimiento de las plantas micorrizadas se utilizó un sistema semimecanizado mediante el uso de un barreno perforador, con el cual se confeccionaron las casillas de plantación. La dimensión de las casillas fue de 40 cm de diámetro y 50 cm de profundidad. Luego de colocar las plantas en las casillas se rellenó con el suelo removido y se aplicó una dosis de riego inicial de 5 litros por planta. Posterior al riego se cubrió la superficie de cada casilla con mulch plástico para mantener la humedad alrededor de las plantas y a la vez minimizar la competencia de malezas. Para la protección mecánica de las plantas se utilizó una malla de alambre, la cual fue instalada alrededor de cada una, dispuesta en forma cilíndrica con apoyo de un tutor.

### Análisis cualitativo de ectomicorizas en plantaciones

A la fecha se han colectado muestras de ectomicorizas en una de las plantaciones establecidas. Esta plantación está ubicada en el sector precordillerano de Chequenlemu, Comuna de Curicó (35° 05' S) y esta constituida por plantas de *Q. ilex*, *Q. robur*, *C. avellana* y *N. obliqua*, distribuidas de la siguiente manera:

- 130 encinas (*Q. ilex*) con marco de plantación 6 X 6 = 4.680 m<sup>2</sup> de superficie
- 50 avellanos (*C. avellana*) con marco de plantación 6 X 4 = 1.200 m<sup>2</sup> de superficie
- 85 encinos (*Q. robur*) con marco de plantación 6 X 7 = 3.570 m<sup>2</sup>.
- 18 robles (*Nothofagus obliqua*) con marco de 6 X 7 = 756 m<sup>2</sup>.

Las muestras fueron colectadas en agosto de 2004, después de 9 meses del establecimiento de la plantación.

La metodología de recolección de muestras es laboriosa y complicada. Para conocer el estado de la micorrización es necesaria la toma periódica de muestras y los muestreos se deben realizar en primavera y otoño, por ser estas épocas en las que el micelio del hongo se encuentra en su mayor actividad. En nuestro caso el primer muestreo de micorizas en campo se limitó a nivel de pre-muestreo, debido a la época en que se colectaron las muestras, además solo con el objetivo de obtener datos iniciales e indicadores de la supervivencia de la micoriza de *T. melanosporum* en la plantación en estudio.

Debido a que las plantaciones fueron establecidas recientemente, la recolección de muestras de micorizas se limitó a un muestreo a nivel de cuello de las raíces de las plantas para no comprometer su desarrollo y además tratando de capturar raíces de crecimiento activo fuera del radio del cepellón.

Para realizar el pre-muestreo, se colectaron 4 muestras de raíces por especie (*C. avellana*, *Q. ilex*, *Q. robur* y *N. obliqua*) cuyos individuos fueron elegidos aleatoriamente dentro de la plantación. De las plantas seleccionadas, se tomaron las muestras de la zona cercana al cuello, excavando un hoyo de 15 a 20 cm. de diámetro en un punto elegido al azar. Luego las raíces se lavaron y humedecieron para evitar su deshidratación y se guardaron en frascos etiquetados con su notación correspondiente. Una vez en laboratorio, las muestras se lavaron cuidadosamente en una placa Petri. Las muestras que presentaron mayor suciedad se remojaron en agua agregando unas gotas de surfactante TWEEN 80. El lavado de las raíces se completó en la placa bajo lupa binocular, con ayuda de un pincel fino para extraer los restos de sustrato y suciedad.

Para el análisis de las micorizas cada muestra fue analizada tanto macroscópicamente como microscópicamente. En primer lugar las observaciones se realizan usando lupa binocular, separando las micorizas que difieren macroscópicamente. En estas observaciones se consideran aspectos como el tipo de ramificación, longitud del sistema micorrícico, longitud de las puntas sin ramificar, presencia de rizomorfos, características de la superficie del manto, etc. Para la determinación se elige bajo lupa binocular la micoriza a observar, luego se coloca en un portaobjetos agregando unas gotas de ácido láctico, se tapa con cubreobjetos y se observa al microscopio. Para la determinación de las micorizas, la información obtenida en estos análisis fué contrastada con trabajos publicados en bibliografía especializada sobre el estudio de ectomicorizas del género *Tuber* (17); (12); (6); (13).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Micorrización de las plantas inoculadas en invernadero:

A partir de los análisis de micorrización se obtuvieron diferentes indicadores que permiten evaluar la calidad de lotes de producción analizados, estos indicadores reflejan, tanto los niveles de micorrización con *T. melanosporum*, como también la presencia de hongos de ectomicorriza contaminantes. Los resultados de este estudio fueron obtenidos a partir de la evaluación de 18 muestras por especie simbionte, mediante un muestreo volumétrico de los cepellones, los cuales son resumidos en la Tabla 6.

Donde N°TM/P = Número promedio de micorrizas de *T. melanosporum* por planta

Est.C/TM = Estándar de calidad de la micorrización con *T. melanosporum*

Gr/TM = Grado de micorrización porcentual con *T. melanosporum*

Gr/MC = Grado de micorrización porcentual con micorrizas contaminantes

Ppm/TM = Porcentaje de plantas con presencia de micorrizas de *T. melanosporum*

Ppm/MC = Porcentaje de plantas con presencia de micorrizas contaminantes

Los resultados indicados en la Tabla 6, muestran que los mayores niveles de micorrización se obtuvieron en las especies *Q. ilex*, *Q. robur* y *C. avellana*, las cuales son simbiontes naturales de *T. melanosporum*. De acuerdo a la metodología de control desarrollada por Reyna (13), *N. obliqua* aunque presentó muy buenos niveles de micorrización en términos absolutos, medido por el número de micorrizas por planta, el grado de micorrización es considerado bajo (14%), de acuerdo a las metodologías de control propuestas algunos autores europeos (3);(7);(11), las cuales utilizan datos porcentuales. Según estos autores se considera que a partir de un 30% de micorrización con *T. melanosporum* la planta presenta una calidad adecuada para el establecimiento de plantaciones. En el caso de *N. glauca* los resultados de micorrización obtenidos han sido bajos, además solo un 33% de las plantas analizadas presentaron micorrizas de *T. melanosporum*.

Tabla 6. Control de calidad de los lotes analizados de acuerdo al método propuesto

| Hospedero                 | N°TM/P | Est.C/TM  | Gr/TM (%) | Gr/MC (%) | Ppm/TM (%) | Ppm/MC (%) |
|---------------------------|--------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 6.325  | Excelente | 47        | 3         | 100        | 10         |
| <i>Quercus robur</i>      | 4.300  | Excelente | 46        | 8         | 100        | 17         |
| <i>Corylus avellana</i>   | 6.025  | Excelente | 50        | 8         | 100        | 12         |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 2.672  | Muy bueno | 14        | 0         | 90         | 0          |
| <i>Nothofagus glauca</i>  | 107    | Bajo      | 2         | 0         | 33         | 0          |

Los resultados de micorrización de *Nothofagus sp.* con *T. melanosporum* obtenida en nuestros trabajos es reportada por primera vez a nivel internacional, además este resultado indica que es posible utilizar estas especies simbiontes en plantaciones para el cultivo de trufa en Chile, lo que abre interesantes

perspectivas. Sin embargo, se debe destacar los mejores resultados obtenidos en *N. obliqua*, especie que parece presentar una mayor afinidad simbiótica con *T. melanosporum*, comparado a *N. glauca*.

En el caso de *Quercus* sp. y *C. avellana* los estándares de calidad aplicados indican que se obtuvo una excelente micorrización con *T. melanosporum*, basado en los valores de micorrización absolutos (Número de micorrizas por planta), además los resultados porcentuales de micorrización con *T. melanosporum* para estas especies, variaron entre un 46% a 50%, lo cual es comparable a los resultados de micorrización obtenidos por viveros comerciales en Europa, donde se acepta que a partir de un 30% de micorrización la planta presenta una calidad adecuada para ser establecida en campo.

Cabe destacar que *Quercus* sp. y *C. avellana* presentaron contaminaciones con *Hebeloma* sp. que es una especie de hongo de ectomicorriza común en ambientes de vivero, la cual también ha sido reportada como micorriza contaminante en viveros europeos. A pesar de la presencia de esta especie en las muestras analizadas, los niveles de micorrización con *Hebeloma* sp. son considerados bajos y se encuentran dentro de los rangos de contaminación aceptados por las metodologías de control usadas en Europa (3);(7);(11);(13), donde el límite máximo aceptado en la micorrización con hongos contaminantes se sitúa en alrededor de 20%. Este porcentaje es calculado como proporción del número de micorrizas contaminantes en relación al número de micorrizas de *T. melanosporum*.

Otro aspecto importante a destacar es que en las especies nativas (*Nothofagus* sp.) no se registró la presencia de *Hebeloma* sp., a diferencia de *Quercus* sp. y *C. avellana*, aunque todas las plantas fueron cultivadas en las mismas condiciones. De estos resultados podemos establecer como hipótesis que *Hebeloma* sp. no presenta afinidad simbiótica con *Nothofagus* sp. bajo las condiciones de este estudio.

#### Análisis cualitativo de ectomicorrizas en plantaciones

Para evaluar la supervivencia inicial de *T. melanosporum* en la plantación estudiada, las muestras colectadas fueron identificadas en base a sus caracteres morfológicos. Las micorrizas de *T. melanosporum* presentan características morfológicas bien definidas y su identificación no presenta dificultades, sin embargo, muchas veces es difícil diferenciar morfológicamente entre especies del género *Tuber* (9), las cuales normalmente coexisten en las plantaciones europeas. En el caso de plantaciones establecidas en Chile, difícilmente encontraremos otras especies del género *Tuber*, aunque existen ejemplos de plantaciones de *T. melanosporum* establecidas en Nueva Zelanda donde se han reportado fructificaciones de *Tuber borchii* y *Tuber maculatum*, las cuales son nativas de Europa, evidenciando que estas especies se encontraban introducidas en ese país en forma accidental (8).

Los datos obtenidos en nuestros análisis indican la presencia de *T. melanosporum* en el 100% de las muestras analizadas, lo que confirma que la sobrevivencia de las micorrizas de trufa ha sido exitosa y la simbiosis obtenida en condiciones de invernadero es mantenida después del establecimiento de las plantaciones en campo. El morfotipo de las ectomicorrizas ha sido confirmado con las descripciones de *T. melanosporum* definidas en la bibliografía especializada (17); (12); (6); (13).

La abundancia de ectomicorrizas fue estimada visualmente bajo lupa binocular, no realizándose conteos. De estos análisis se desprende que la micorrización con *T. melanosporum* en las condiciones de establecimiento presenta un desarrollo consistente en todas las especies simbiotes (Figura 4), destacándose los niveles de micorrización observados en *Quercus* sp., donde las muestras analizadas presentaron a una mayor proporción de ápices micorrizados con *T. melanosporum* y menor presencia de contaminantes en comparación a *C. avellana*. En el caso de *N. obliqua* las muestras analizadas

también indican un desarrollo consistente de *T. melanosporum*, y además no presentaron micorrizas contaminantes.



Figura 4. morfotipo de ectomicorrizas de *T. melanosporum*

La mayor abundancia de contaminantes se observó en *C. avellana*, encontrándose 2 morfotipos distintos de ectomicorrizas correspondientes a hongos Basidiomicetos. Una de estas especies se identificó como *Hebeloma* sp. cuyo morfotipo corresponde al mismo encontrado en las plantas analizadas en vivero, lo cual indica que este hongo también se adaptó inicialmente a las condiciones de establecimiento en campo y es capaz de competir con *T. melanosporum* en el complejo micorrícico. El segundo morfotipo de micorriza encontrado, corresponde a una especie aún sin identificar.

La mayor presencia de contaminaciones observadas en *C. avellana* (Figura 5), concuerda con lo expuesto por Reyna, (14), quién destaca la mayor facilidad del avellano para ser colonizado por micorrizas contaminantes en las plantaciones truferas europeas.



Figura 5. Morfotipos de ectomicorrizas contaminantes observadas

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los análisis de micorrización en vivero indican que las técnicas de inoculación y cultivo han sido exitosas y ellas nos permiten direccionar nuestros trabajos futuros para optimizar las condiciones de cultivo con el objetivo de implementar un método de producción comercial que asegure un suministro de plantas de alta calidad.

Los hospederos más adecuados para la inoculación con *T. melanosporum* fueron *Quercus* sp. y *C. avellana*, debido a los buenos niveles de micorrización obtenidos, sin embargo, no debemos descartar a *N. obliqua* como una especie nativa posible de incorporar en los programas de inoculación, ya que los resultados obtenidos con esta especie son considerados buenos.

La sobrevivencia de las micorrizas de *T. melanosporum* en campo ha sido exitosa, lo que indica que las técnicas de establecimiento de las plantaciones y el posterior cultivo han sido adecuados para mantener la simbiosis con las distintas especies hospederas, reflejando además que este hongo presenta una buena adaptación inicial a las condiciones agroclimáticas del sitio en estudio. Estos resultados abren un futuro promisorio en cuanto la introducción de este cultivo como una nueva alternativa agroforestal para desarrollar en la zona centro sur de Chile.

## BIBLIOGRAFÍA

(1) ASTIER J. "Truffles blanches et noires", 1998 pp: 68,69 Ed. Louis-Jean

- (2) BENCIVENGA, M., "Experiencias italianas en truficultura: Problemática, Perspectivas y Expectativas". En " las Jornadas Internacionales sobre Truficultura en Aragón". 2000. Servicio de Investigación Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, España.
- (3) BENCIVENGA, M.; GOVI, G.; GRANETTI, B.; PALENZONA, M.; PACIONI, G.; TOCCI, A.; ZAMBONELLI, A.: Presentazione del metodo di valutazione delle piante micorrizate con funghi del gen. *Tuber* bassato sulla caratterizzazione morfologica delle micorrize. 1995. In press.
- (4) CARTIÉ, G; PALAZÓN, C.; DELGADO, I.; BARRIUSO, J. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt, y en la supervivencia de las plantas. En Actes du V Congrès International Science et culture de la Truffe. 1999. Aix-en-Provence (France).
- (5) CHEVALIER, G. Y FROCHOT G. La truffe de Bourgogne, *Tuber uncinatum* Chatin. 1997. Pétrarque, Levallois-Perret, Francia.
- (6) ETAYO, M.L. Y DE MIGUEL, A.M.. Estudio de las ectomicorrizas en una trufera cultivada situada en Oloriz (Navarra). Publicaciones de biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica, 1998. 11: 55-114.
- (7) FISCHER C. & COLINAS C. Propuesta de metodología para la certificación de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum*. para aplicación comercial. Reunión de coordinación INIA sobre truficultura, Zaragoza, España. 12 junio de 1997.
- (8) HALL, I.; BROWN, G. AND BYARS, J. "The black truffle: its history, uses and cultivation". New Zealand Ministry of Agriculture & Fisheries. 2001. 107 pp. Second Edition.
- (9) HALL I. Y WANG, Y. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodys: *Tuber melanosporum*. In: Proceedings of the First International Meeting on "Ecology, Phisiology and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushroom". 1998. Swedish Universtity of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- (10) LEFEVRE C. Y HALL, I. The status of truffle cultivation. A global perspective. In "Proceedings of the Fiftth International Congress on Hazelnut" ISHS Acta Horticulturæ 556. 2001. Editor S.A. Mehlenbacher.
- (11) PALAZON C., DELGADO I., CARTIE G., BARRIUSO J., ESTEBAN H. Propuesta de una metodología de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* spp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* para la obtención en España de la etiqueta de calidad. In: Proceedings of the Fifth International Congress on Truffle, Aix-en-Provence, France. 1999. Fédération nationale des trufficulteurs eds., Paris.
- (12) RAUSCHER, T.; AGERER, R. AND CHEVALIER, G. Ektomycorrhizen von *Tuber melanosporum*, *Tuber mesentericum* und *Tuber rufum* (Tuberales) an *Corylus avellana*. Nova Hedwigia 1995. 61: 281-322.
- (13) REYNA, S., Aproximación a una selvicultura trufera . Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. 1999. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- (14) REYNA, S., Trufa, Truficultura y Selvicultura Trufera. 2000. 229 pp. Ediciones Mundiprensa, Madrid.
- (15) REYNA, S.; RODRÍGUEZ BARREAL, J.; FOLCH, L.; PÉREZ BADIA, R.; GARCÍA, S.; JIMÉNEZ, E. 2002. Truffle silviculture in Mediterranean forests. In: Edible mushrooms and their cultivation, Hall, I.; Wan, Y.; Zambonelli, A. and Danell, E. ed. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Christchurch, New Zealand. 2003. New Zealand Institute For Crop and Food Research Limited, Christchurch.
- (16) RIOUSSET, G.; CHEVALIER, G.; BARDET, M.C. "Truffles d'Europe et de Chine" 2001 pp: 66,67. Ed. Inra editions.
- (17) ZAMBONELLI A.; SALOMONI S.; PISI A. Caraterizzazione anatomo-morfologica delle micorrice di *Tuber* ssp. su *Quercus pubescens* Willd. mic. Ital. 1993, 3 , 73-90

## ANEXO 7.1.



**La Universidad Católica del Maule y la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), tienen el agrado de invitar a Ud. a participar en un día de campo del proyecto "Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario".**

Dicho evento se realizará el día jueves 26 de mayo, de 15:00 a 17:30 Hrs. y el lugar de encuentro será en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Católica del Maule, ubicada en Avenida San Miguel 3605, Talca. En la ocasión, se visitará una trufera establecida en la última temporada, que está ubicada en la ruta Talca-Duao, fundo "El Canelo". El tema central de esta actividad será informar los avances del proyecto, tanto en la producción de planta micorrizada como la evolución de la misma en campo.

La participación a esta actividad es sin costo y desde ya agradecemos su presencia.

Talca, mayo de 2005





## ANEXO 7.2.

### Desarrollo inicial de una Trufera en la zona central de Chile

#### **Resumen**

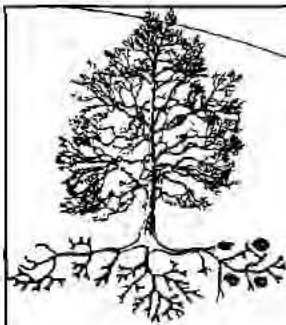
Las condiciones agro-ecológicas de algunas áreas de Chile central son muy similares a las mejores áreas productoras de trufa negra de Europa. Estas áreas se localizan principalmente en el valle central de Chile, entre 35° y 40° latitud de S, y la pre-cordillera de los Andes entre 33° y 35° S, como las situaciones más frías. Por otra parte, contrariamente a Europa donde las tierras normalmente presentan un pH alto (7,5 a 8,5) la mayoría de las tierras apropiadas en Chile tiene un pH que va de 5,5 a 7,0. Esta diferencia en el pH puede corregirse por medio de la aplicación de la piedra caliza molida.

Para investigar el comportamiento de *Tuber melanosporum* en campo, se instalo una trufera experimental en Chile central, de coordenadas 35° 32' S y 71° 36' W. El establecimiento de la unidad se realizo en el mes de julio de 2004, sobre un suelo franco-arcillo-arenoso con un pH de 5,82 puntos. El suelo fue encalado con 18 toneladas de carbonato de calcio, cinco meses antes del establecimiento.

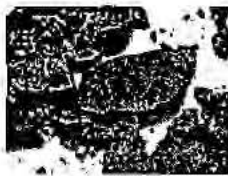
La planta inoculadas utilizada en el establecimiento fueron de las especies *Quercus ilex*, *Q. robur* y *Corylus avellana*, las que presentabas una carga de 6325, 4300 y 6025 ápices micorrizados por planta, respectivamente. Las cuales fueron producidas en el vivero de Universidad Católica del Maule.

Después de 9 meses de establecida la plantación se realizo un primer monitoreo radicular. Las plantas analizadas de *Q. ilex*, *Q. robur* y *C. avellana* presentaron índices de micorrización de 43 %, 47 % y 68 %, respectivamente, sin la presencia de otros hongos de ectomicorrizas.

# ANEXO 7.3



## Truficultura: Establecimiento de una trufera en suelos moderadamente ácidos



Actividad N° 1 Selección de las trufas, se verifica si corresponden a la especie deseada



Actividad N° 2 producción de plantas en invernadero



Actividad N° 3 Inoculación de las plantas huésped para nuestro hongo



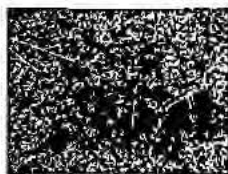
Actividad N° 4 Período de incubación, hasta que se forma la simbiosis



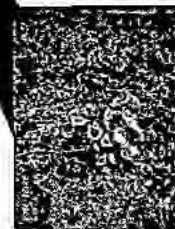
Actividad N° 5 Período de endurecimiento de nuestra planta micorizada



Actividad N° 6 Preparación del suelo, consiste en la incorporación de piedra caliza molida, con el objetivo de subir nuestro pH a 7,5 puntos como mínimo



Actividad N° 7 Plantación de nuestra planta trufera en marcos de plantación amplios, del orden de 8 x 5 m



Actividad N° 8 Período de adaptación de la planta huésped



Actividad N° 9 Primeros manejo de malezas, enfocados a favorecer el desarrollo radicular y la multiplicación de *Tuber melanosporum*



Actividad N° 10 Luego del primer periodo seco podemos decir que nuestra plantación está establecida



Actividad N° 11 Luego de establecida nuestra plantación comienza el control de la maleza en campo



Actividad N° 12 Este trabajo se realiza con el fin de evaluar la invasión de *Tuber melanosporum* en el sistema radicular de la planta huésped



Micorrizas de *Tuber melanosporum* en *Corylus avellana*

# ANEXO 7.4.



## Truficultura: Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario.



### RESUMEN

El proyecto contempla desarrollar e implementar las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario. Con énfasis en el desarrollo de campo de desarrollo para zonas rurales depauperadas, congresando una opción productiva rentable y a la vez rentable y sustentable que supere a las prácticas tradicionales en la agricultura.



En una primera etapa del proyecto, se desarrollarán e implementarán las tecnologías para la producción de plantas inoculadas en vivero, tanto con las técnicas y estándares necesarios para el control de calidad de las plantas, lo que permitirá generar las bases que permitan mejorar la rentabilidad del cultivo en Chile.



El proyecto contempla desarrollar e implementar las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario. Con énfasis en el desarrollo de campo de desarrollo para zonas rurales depauperadas, congresando una opción productiva rentable y a la vez rentable y sustentable que supere a las prácticas tradicionales en la agricultura.

Por otra parte, se evaluará el potencial para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, las condiciones de áreas de la zona centro-sur de Chile, considerando tanto a los requerimientos específicos del cultivo y técnicas de desarrollo. Asimismo, se desarrollarán las perspectivas comerciales para la truficultura en Chile, estableciendo el perfil del mercado y las estrategias económicas para los pequeños y medianos productores.



Con la ejecución del proyecto se espera establecer las bases que permitan desarrollar e implementar las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario. Con énfasis en el desarrollo de campo de desarrollo para zonas rurales depauperadas, congresando una opción productiva rentable y a la vez rentable y sustentable que supere a las prácticas tradicionales en la agricultura.



En conclusión, el desarrollo del proyecto a largo plazo generará una nueva línea de negocio, ya sea para productores del sector silvoagropecuario, como también empresas de vivero y desarrollo, quienes se beneficiarán del desarrollo de la tecnología, a través de la capacitación, con lo que podrán generar un producto y servicios.

### OBJETIVOS DEL PROYECTO

#### GENERAL

- Desarrollar e implementar tecnologías adecuadas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario.

#### ESPECÍFICOS

- Desarrollar e implementar las técnicas de inoculación y cultivo en vivero para la producción de plantas de trufa (*Chaetomium* spp.) y evaluarlas en campo (*Chaetomium* spp.) asociadas con *Tuber melanosporum* Vitt., asegurando además la inoculación en especies del género *Chaetomium*.
- Desarrollar e implementar protocolos para el control del proceso de inoculación y calidad de plantas inoculadas con *Tuber melanosporum* en vivero, produciendo las normas de inoculación y así evitar la contaminación con especies del género *Tuber* sin valor comercial.
- Evaluar la evolución de la inoculación con *Tuber melanosporum* Vitt. en 3 unidades experimentales establecidas bajo diferentes condiciones ambientales y de cultivo.
- Evaluar el potencial de desarrollo de *Tuber melanosporum* Vitt. como un cultivo en Chile, en relación a los requerimientos ecológicos del cultivo, aspectos ambientales y socio-económicos.
- Difundir y transferir las tecnologías a productores, instituciones, profesionales y técnicos del sector, poniendo a disposición de los interesados conocimientos los protocolos para el control de calidad de plantas inoculadas.

### FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile.  
Código: FA-PI-C-2001-1-A-025

### AGENTE EJECUTOR

Universidad Católica del Maule (UCM)

### AGENTES ASOCIADOS

- Centro de estudios ambientales (CEAM), Valencia, España.
- Luis Molina Rojas (Agricultor), Chequenele, Los Nicheles, Gu.
- Yves Paul Stalmetz (Agricultor), Maitland, San Clemente.
- Ruby Correa Pardo, Santa Elena de Chequenele, San Clemente.
- Salmones Colón, El Canelo, Duque, Maule.
- Sociedad Agrícola Río Puelo, La Posa, La Unión.
- Carlos Tribuna Olarte, La Unión.
- Sociedad Agrícola Río Chapu, Malalilhue, Lanco.
- Jacqueline Klotzschewer Wilson, Coyhaique.
- Donald Fitchel Morán, Panguipulli.
- Ricardo Suárez Olave, Abta Pina.



## ANEXO 7.5.

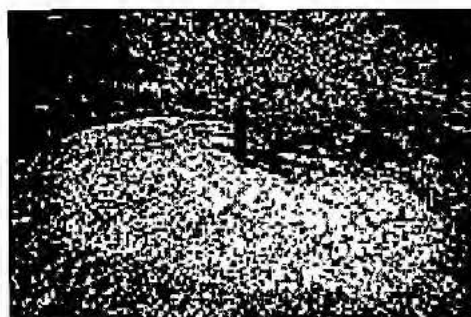
### **CUIDADOS CULTURALES POST- PLANTACION DE UNA TRUFERA ESTABLECIDA EN SUELOS ACIDOS**



**Proyecto:** “Truficultura: Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”

## Introducción

Cuando se establece algún cultivo frutícola hay muchas cosas claras que no suceden en Truficultura. En primer lugar, se ve si la planta ha arraigado o no, si se está desarrollando en forma normal, si hay o no floración, si los frutos están madurando en forma normal, si existe la necesidad de regar por una deshidratación de la planta, etc. En Truficultura esto no se puede determinar, pues se trata de un cultivo sobre otro, es decir, un cultivo indirecto. Se cultiva un hongo en las raíces de un árbol, y lo que se ve es la parte aérea del árbol, si este está vigoroso o bien atacado por alguna plaga foliar, etc. En consecuencia, se desconoce lo que pasa en las raíces de éste, sin saber si las micorrizas de *T. melanosporum* han sido desplazadas o no, si el micelio está deshidratado, o bien está con exceso de agua. Resulta imposible ver qué es lo que está sucediendo y cómo se está desarrollando. Recién después de un periodo de cuatro a siete años se comienza a ver algo, que tampoco es seguro, que corresponde a la formación del quemado (también conocido como Brulé o calvero), que indica la zona de acción del hongo. Sólo al cabo de cinco a diez años, dependiendo de la especie huésped, se comienza con la cosecha de las primeras trufas negras, pero tampoco se verá cómo se forman, crecen y maduran, pero al menos se habrá salido de la incertidumbre.



Esta reflexión debe ser asumida cuando se tome la decisión por la **Truficultura** y es uno de los motivos por los cuales es necesario ajustarse de la forma más estricta a los parámetros ecológicos del hongo.

Antes de comenzar los trabajos culturales post plantación es conveniente considerar una serie de sucesos que se producen a lo largo del desarrollo de la plantación, esto a fin de mejorar los criterios de planificación y ejecución de los trabajos culturales.

Los cuidados culturales tienen incidencia directamente en dos variables : la humedad y la insolación del suelo presentes en el sitio de acción de las raicillas.

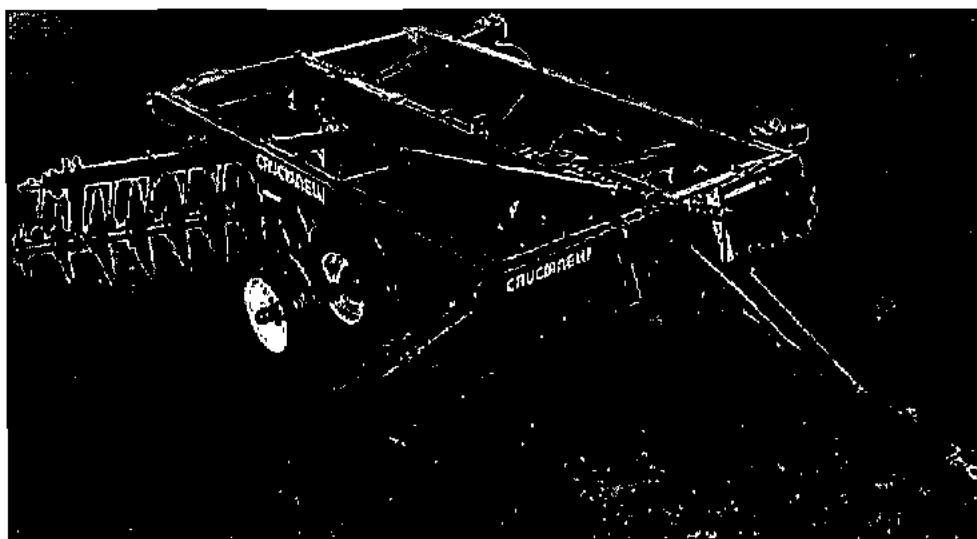
Se considera como periodo de colonización a partir de la extensión del micelio y la invasión micorrícica de *T. melanosporum* en la rizósfera. Para que dicho fenómeno se produzca en forma conveniente es necesario generar adecuadas condiciones ecológicas para que de esta manera se dificulte la entrada y proliferación de otras micorrizas competidoras.

## Manejo del Suelo

El laboreo se realiza con objeto de mejorar la aireación del suelo, incrementando su capacidad de retención de agua y favoreciendo el desarrollo del hongo de la trufa.

El tratamiento al suelo debe efectuarse con aperos con control de profundidad - cultivadores o gradas<sup>1</sup> (nunca rotovator) - a profundidad no mayor a los 10 ó 12 cm. Algunos especialistas recomiendan una profundidad máxima de 5 a 6 cm el primer año y no mayor de 10 a 15 cm en el segundo, hasta el año 7º u 8º. La mejor época para el laboreo del suelo es en primavera.

Un laboreo excesivo, 3 a 4 labores o más por año, puede tener un efecto negativo sobre la estructura y la porosidad del suelo por efecto de la destrucción de los agregados y su compactación, lo que puede provocar un efecto inverso al que se busca en truficultura y a disminuirla actividad microbiana.



En suelos arenosos o muy sueltos, la aireación natural puede ser suficiente para justificar no laborear el suelo.

El laboreo se realiza una vez han comenzado las primeras lluvias de primavera, pero con el terreno lo suficientemente suelto como para evitar compactación, en los meses de septiembre u octubre.

---

<sup>1</sup> Gradas: Sirve para allanar el terreno con unas cuchillas redondas, entierran las semillas y limpian de malas hierbas.

## Manejo de las malezas

Existen cuatro metodologías para el manejo de las malezas en una plantación trufera.

### ***a) Enyerbado:***

Puede ser natural o artificial y al contrario del laboreo, el enyerbamiento favorece el desarrollo de la actividad biológica y de la microflora del suelo, actividad que más tarde será importante para el desarrollo de la trufa.

Cuando la parcela entre en producción, será interesante tener una cobertura vegetal sobre la totalidad o solamente una parte de la plantación, controlado por el paso de una desbrozadora.



### ***b) Modelo Mixto:***

Comprende zonas trabajadas regularmente y zonas enyerbadas (en medio de la calle por ejemplo).



### ***c) Desyerbado químico***

Existe la posibilidad de usar herbicidas a base de glifosato (Roundup®) o glufosinato amónico (Basta®), aunque otros autores desaconsejan el glifosato o indican que puede tener un impacto negativo sobre el equilibrio de la fauna y la microflora del suelo y el producto de su degradación persiste en el suelo. La simazina tiene efectos negativos en trufas de menos de 3 años de plantación.



#### ***d) Desherbado manual-mecánico***

También existe la posibilidad de controlar las malezas mecánicamente, ya sea usando maquinaria entre hileras y labranza manual en la hilera de plantación.



### **Riegos**

#### ***Implantación y preproducción (1º-5º año)***

Es recomendable regar regularmente los primeros años hasta que se establezca el sistema radical y, en particular, el primer año se deberían regar las plantas en caso de sequía prolongada (alrededor de 20 días dependiendo del tipo de suelo y las condiciones climáticas, particularmente el viento). Se aconseja aportar cantidades de agua de 30 a 50 litros por m<sup>2</sup> mensualmente, en forma parcial, lo que puede ser en dosis semanales o quincenales, según la intensidad de la sequía y tipo de suelo. Un riego superior a 110 litros mensuales es negativo para la proliferación de micorrizas de *T. melanosporum* en la fase de establecimiento.

En caso de no poder regar utilizando un sistema de riego, es aconsejable regar manualmente e instalar un *mulch*, esto no parece que sea desfavorable para el mantenimiento del hongo, pero es desaconsejable conservarlo de forma prolongada. Estos materiales pueden ser paja de algún cereal o bien gravilla de piedra caliza.



### **Acolchados o Mulching**

Los acolchados tienen como finalidad evitar las pérdidas de agua del suelo por evaporación en el verano. Es uno de los trabajos más sencillos y que mejores resultados ha dado a corto plazo dentro del proyecto.



Los acolchados se pueden realizar con piedra caliza machacada de diámetros entre 10 y 30 mm, una vez finalizado el laboreo y con el suelo algo húmedo. También pueden emplearse otro tipo de materiales vegetales existentes en el terreno.

Para la utilización de cualquier tipo de cubierta vegetal hay que tener en cuenta la necesidad de impedir que se incorpore materia orgánica en el suelo, principalmente si es de carácter ácido (restos de coníferas) o bien que pueda



desvirtuar la relación carbono / nitrógeno en el suelo (paja de cereales). Por este motivo, se aconseja colocar el acolchado vegetal a comienzos de la temporada seca, es decir, octubre a noviembre y retirarla en las primeras lluvias del otoño.

## Poda

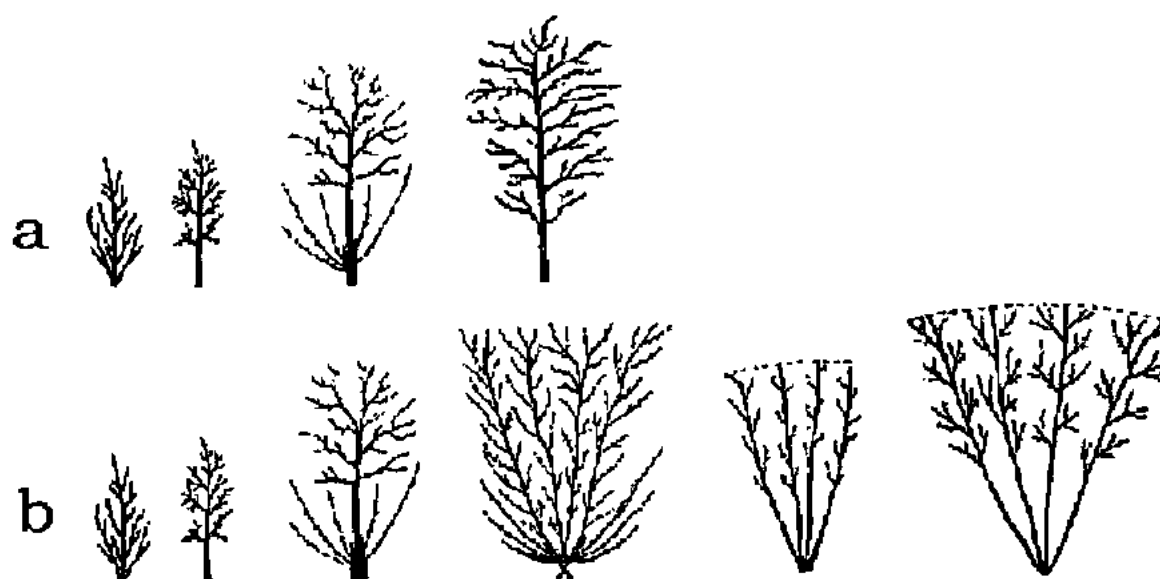
Los objetivos de la poda en esta etapa son varios: limitar el crecimiento de los árboles y de su sistema radicular en condiciones vigorosas y anticiparse al cierre de copas, pero también se continuará con las podas de formación para crear las condiciones favorables al desarrollo de las trufas.

En climas calurosos y con fuerte insolación se puede podar la parte alta del árbol para favorecer su aireación y conservar ramas bajas, que harían sombra al suelo y permitirían amortiguar las variaciones de temperatura.

Se recomienda aplicarla todos los años en la fase de reposo vegetativo, preferentemente en septiembre. Sin embargo, algunos autores recomiendan efectuar la poda en el período estival. Esta poda en verde consiste en una poda ligera y afecta el sistema aéreo disminuyendo su vigor.

Estrategias de cómo podar *Corylus avellana* con aptitud trufera:

- a. Es un esquema más arborícola y es usado por las trufas artificiales, para favorecer la insolación del suelo.
- b. Este esquema de poda es usado frecuentemente en el manejo de trufas naturales, hay algunos especialistas que indican que esta es la forma de podar *Corylus* es la que se asemeja más a los árboles productores en forma natural.



Estrategias de cómo podar los *Quercus* con aptitud trufera:



### Encalados Correctivos

Los niveles óptimos de pH en suelos truferos van desde los 7,5 a los 8,2 puntos, con una media de 7,9. No se debiera bajar de estos rangos, para lo se recomienda efectuar monitoreos mensuales de pH y encalados correctivos según corresponda. Estos encalados correctivos serán aplicados en la zona de acción radicular, es decir, en la respectiva tasa de riego. Esta estará en directa relación con la altura de los árboles. La relación será: el radio de la tasa es a dos veces la altura del árbol, con un mínimo de 1 metro.

La corrección de pH será de 0,13 kg de  $\text{CaCO}_3/\text{m}^2$  de suelo, por cada décima de pH a corregir. El  $\text{CaCO}_3$  debe ser de granulometría fina.

## ANEXO 7.6



**La Universidad Católica del Maule y la Fundación para la Innovación Agraria (FIA)**, tienen el agrado de invitar a Ud. a participar en una ceremonia de entrega de resultados y cierre del proyecto "Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario".

Dicha actividad se realizará el 28 de diciembre de 2005, entre las 11:00 y 13:00 horas, en el auditorium de Ingeniería de la Universidad, en la Casa Central, Avenida San Miguel N° 3605, Talca.

Esta actividad es sin costo y desde ya agradecemos su presencia.

Talca, diciembre de 2005

## ANEXO 7.7





**Proyecto  
TRUFICULTURA**

**"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"**

---

**Financiamiento:**  
Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile

**Participantes:**  
Universidad Católica del Maule, Chile.  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España

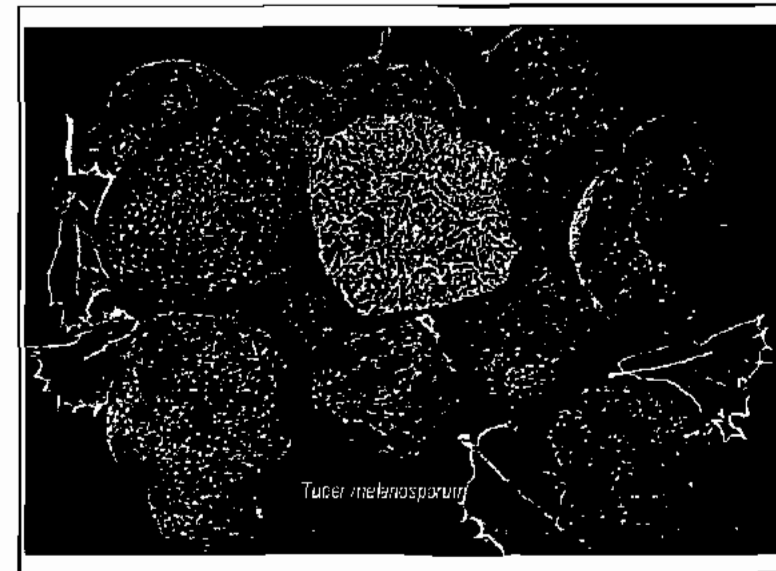
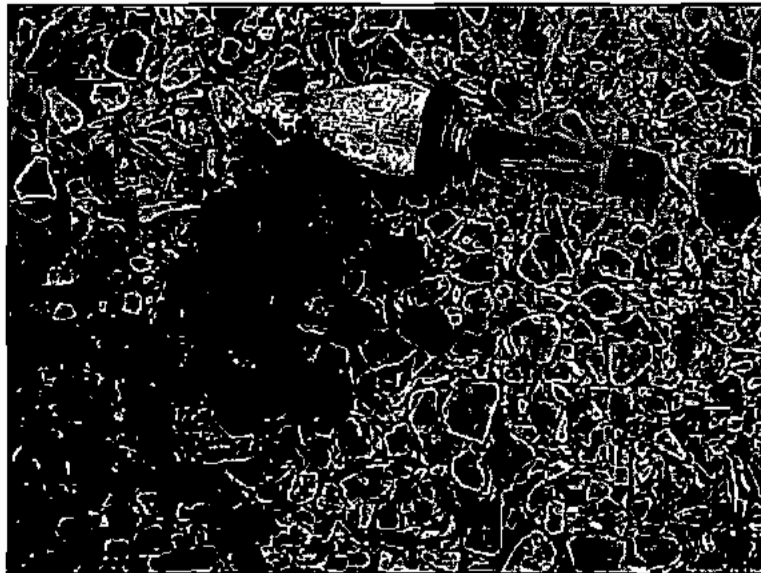
**Fecha Inicio:** Noviembre 2001  
**Fecha Término:** Octubre 2005




### ¿Qué son las trufas?

- Las trufas son los cuerpos fructíferos de hongos micorrizicos Ascomicetos del genero *Tuber*, que se desarrollan bajo la superficie de la tierra, hipogeos.
- Estos hongos viven en simbiosis ectomicorrizica con algunos árboles forestales.
- Su aprecio en la cocina de calidad se debe a su intenso aroma lleno de matices que se fija profundamente en los alimentos

2






## Introducción

- Hasta hoy, el cultivo de trufas ha sido logrado por un número limitado de países en el Hemisferio Norte:
  - Francia,
  - Italia
  - España

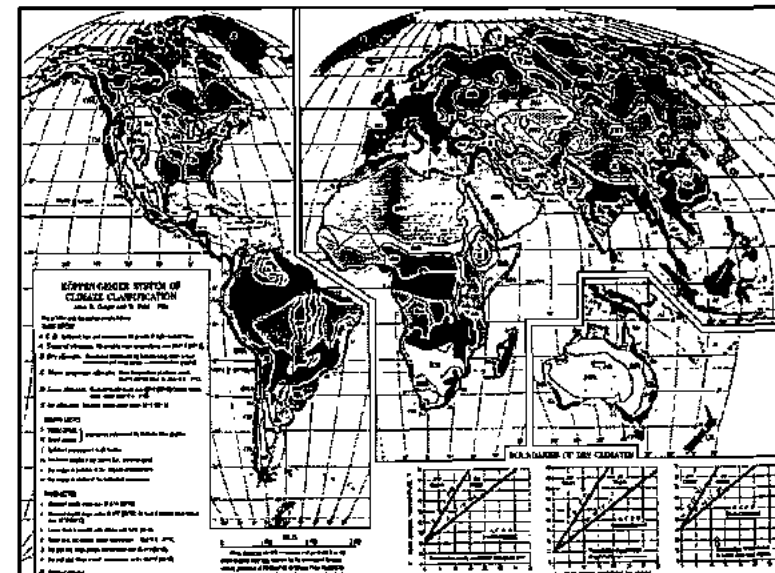
6



## Introducción

- Ultimamente ha sido introducido en:
  - Estados Unidos
  - Nueva Zelanda
  - Australia
- También se conocen trabajos en:
  - Israel,
  - Sud Africa
  - Argentina

7





## Introducción

- Los métodos para el cultivo de trufas se basan en la obtención de plantas micorrizadas bajo condiciones controladas de invernadero
- A pesar de que cada año se producen cientos de miles de árboles infectados, hay una tendencia a la baja en la producción

9



## Introducción

- Experiencias en Nueva Zelanda y Estados Unidos muestran que la producción de trufas es posible en lugares donde las condiciones climáticas y de suelo no son las ideales

10



## Introducción

- La oferta en Chile de hongos micorrícicos comestibles se concentra en unas pocas especies con un relativo bajo valor comercial:
  - *Suillus luteus*
  - *Lactarius deliciosus*

11



## Introducción

- La introducción en Chile de hongos ectomicorrícicos de alto valor comercial ofrece una excelente oportunidad para la creación de nuevas industrias y mercados

12



## Introducción

- *Tuber melanosporum* es una de las especies más valoradas en el mercado internacional
- Algunas áreas en Chile pueden ser ideales para la plantación con plantas inoculadas

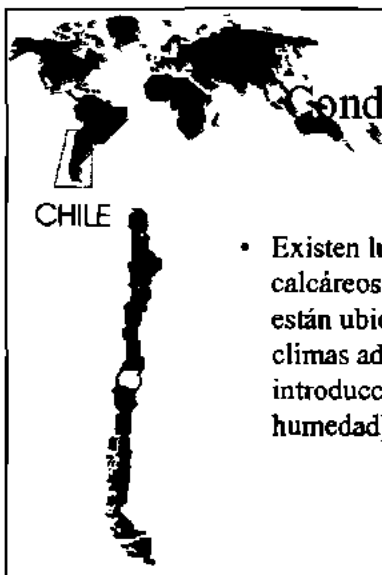
13



## Condiciones Ecológicas en Chile

- La mayoría de los suelos en Chile tiene un pH relativamente bajo: de 5,5 a 7,0
- En Europa los suelos comúnmente presentan un pH alto (7,5 a 8,5)

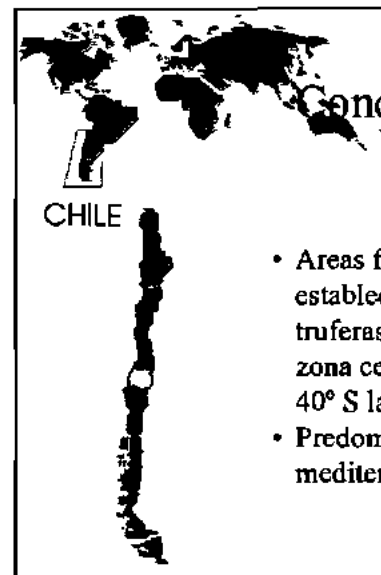
14



## Condiciones Ecológicas en Chile

- Existen lugares que tienen suelos calcáreos (pH alto). Sin embargo, están ubicados fuera de las áreas con climas adecuados para la introducción de trufas (temperatura y humedad)

15



## Condiciones Ecológicas en Chile

- Áreas favorables para establecer plantaciones trufas se encuentran en la zona centro sur de Chile (35° a 40° S latitud)
- Predomina un clima mediterráneo templado

16



## Condiciones Ecológicas en Chile

CHILE

- En los lugares con suelos con pH alto (con alto contenido de material calcáreo) la necesidad de mayor riego es necesario

17



## Condiciones Ecológicas en Chile

CHILE

| PARAMETROS                                                      | Range in France and Italy | Range in Spain                   | Molina, Chile (36° S) |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Annual rainfall (mm)                                            | 800 to 1500 mm            | 500 to 900 mm                    | 900 mm                |
| Mean annual Temperature                                         |                           | 11 to 14 °C                      | 13.8°C                |
| Mean daily temperature in summer (January, Southern Hemisphere) | 17.5 ° to 22 °C           | 19 to 23 °C (optimum 20 to 22°C) | 19.8°C                |
| Mean daily temperature in winter (July, Southern Hemisphere)    | 1 to 8°C                  | 1.6 to 8.2 °C (optimum > 2°C)    | 7.9 °C                |

18



## Condiciones Ecológicas en Chile

CHILE

- *T. melanosporum* y los huéspedes tienen requerimientos ambientales específicos
- En Chile hay adecuadas especies huéspedes con buenas adaptaciones ecológicas

19



## Condiciones Ecológicas en Chile

CHILE

- *Quercus robur*, *Q. ilex* y *Corylus avellana* crecen bien en la Zona Centro Sur de Chile
- El material vegetal está asegurado para la inoculación
- También se pretende inocular con especies nativas: *Nothofagus obliqua* y *N. glauca* (Fagaceae)

20

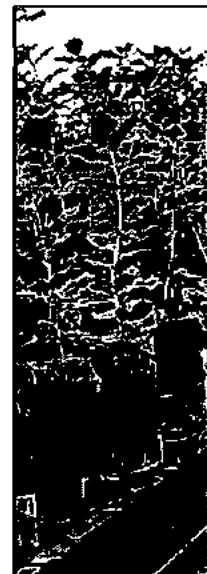




## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - Las trufas fueron colectadas en una propiedad privada ubicada en “El Toro”, Castellón, España
  - Los árboles asociados son encinas (*Quercus ilex* ssp *ballota*)

21



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - Se cosecharon tres kg de trufa entre el 18 y el 25 de enero de 2002
  - 81 ascocarpos fueron colectados, con diámetros que oscilaron entre 2,5 cm a 10,5 cm

22



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - En laboratorio se llevó a cabo su limpieza y desinfección
  - Cada ascocarpo fue cuidadosamente cepillado y la tierra y pequeñas piedrecillas fueron removidas, luego las trufas fueron remojadas en hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos para su desinfección

23



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - El programa de inoculación con trufa fue llevado a cabo por medio de un proceso semi controlado
  - Un invernadero del tipo túnel fue implementado con un sistema de ventilación y control de temperatura

24



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación

- Con un estricto programa se logró mantener condiciones de higiene y seguridad, lo que permitió llevar a cabo un adecuado proceso de inoculación

25

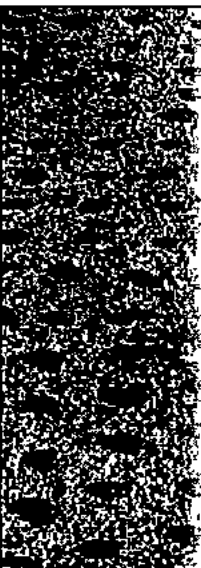


## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación

- Las semillas de *Quercus ilex*, *Q. robur*, *Nothofagus obliqua* y *N. glauca* fueron sujetas a un proceso de desinfección por medio de la aplicación de hipoclorito de sodio al 5%
- Posterior a la desinfección las semilla fueron sembradas en bandejas al interior del invernadero

26



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación

- A las semillas de *Corylus avellana*, se les removió la cubierta y se consideró el mismo proceso de desinfección con cloro
- Las semillas fueron remojadas en una solución de GA3 a 100 ppm durante 24 horas

27



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación

- En noviembre de 2002 las plantas de *Q. ilex*, *Q. robur* y *C. avellana* fueron inoculadas directamente a la raíz usando inóculo de *T. melanosporum*

28



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - Se utilizó talco inerte en polvo como coadyudante para mezclarlo con las esporas deshidratadas
  - Todas las inoculaciones fueron efectuadas con las plantas a raíz desnuda. Posteriormente, las plantas fueron transplantadas a contenedores de 450 ml y 650 ml de cavidad

29



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Programa de Inoculación
  - Las plantas de las especies nativas *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus glauca* fueron inoculadas de igual forma

30



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Análisis de Micorrizas
  - Transcurridos 5-6 meses de incubación en el invernadero se llevó a cabo el análisis de micorrizas
  - Para las especies *Quercus illex*, *Q. robur*, *Nothofagus obliqua* y *N. glauca*

31



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Análisis de Micorrizas
  - Una muestra equivalente al 2% del volumen de cada sistema radical (cepellón) fue tomada usando un cilindro de 1,27 cm de diámetro y de una longitud equivalente al ancho del contenedor

32



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Análisis de Micorrizas
  - Cada muestra de raíz, libre de partículas de arcilla o de materia orgánica, fue inspeccionada a la lupa y al microscopio

33



## Producción de Plantas Micorrizadas

- Análisis de Micorrizas
  - La cantidad de micorrizas de *Tuber*, raíces no micorrizadas y raíces contaminadas fueron contadas

34



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Las condiciones de suelo y clima de la Zona Centro Sur de Chile fueron estudiadas en relación con los requerimientos ecológicos para hongos y árboles huésped

35



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Diferentes sitios fueron evaluados con el objeto de determinar su capacidad para el cultivo de trufa
- 10 sitios de propietarios privados fueron seleccionados, desde la región metropolitana y la XI región

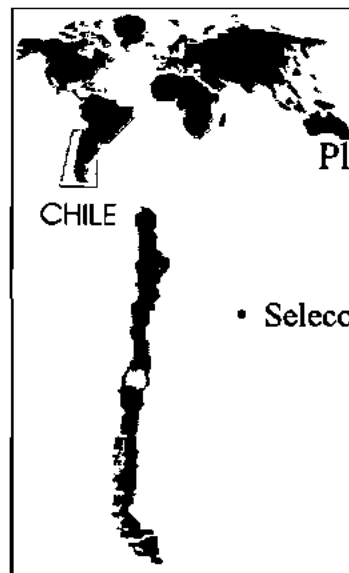
36



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Los sitios seleccionados son:
  - Santa Adela-Maria Pinto
  - Chequenienu-Los Niches (35° 05' S)
  - Maitenes-San Clemente (35° 35' S)
  - El Canelo-Duao
  - Santa Elena de Chequen-Duao
  - Santa Elisa-Parral (36° 8' S)
  - Malalhue-Lanco
  - Huallenu-Panguipulli
  - San Isidro-La Unión
  - La Unión
  - Baguales-Coyhaique

37



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Selección del Sitio

38



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Preparación del Sitio
  - Para la plantación el suelo fue preparado con arado, aplicación de cal y rastra de disco
  - Los suelos de los sitios seleccionados tuvieron un pH entre 5,8 y 7,6

39



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Preparación del Sitio
  - Con el objeto de elevar el pH a un nivel adecuado, se aplicaron 1,3 ton de cal por décima de pH a corregir

40



## Establecimiento de Plantaciones Experimentales

- Preparación del Sitio
  - En función de la reacción del suelo se seguirá aplicando gradualmente diferentes mezclas de cal fina y granulada hasta que el pH se estabilice

41



**¡Muchas Gracias!**

42

## ANEXO 7.8.





**Proyecto  
TRUFICULTURA**

"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"

---

**Financiamiento**  
Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile

**Participantes:**  
Universidad Católica del Maule, Chile.  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España

**Fecha Inicio:** Noviembre 2001  
**Fecha Término:** Octubre 2005



## Presentación de Resultados

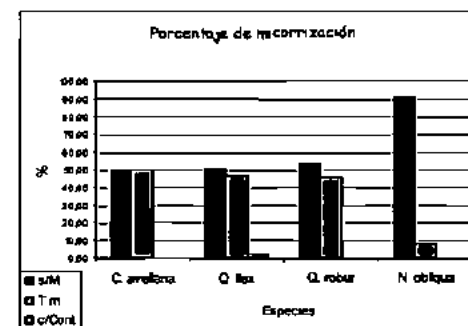


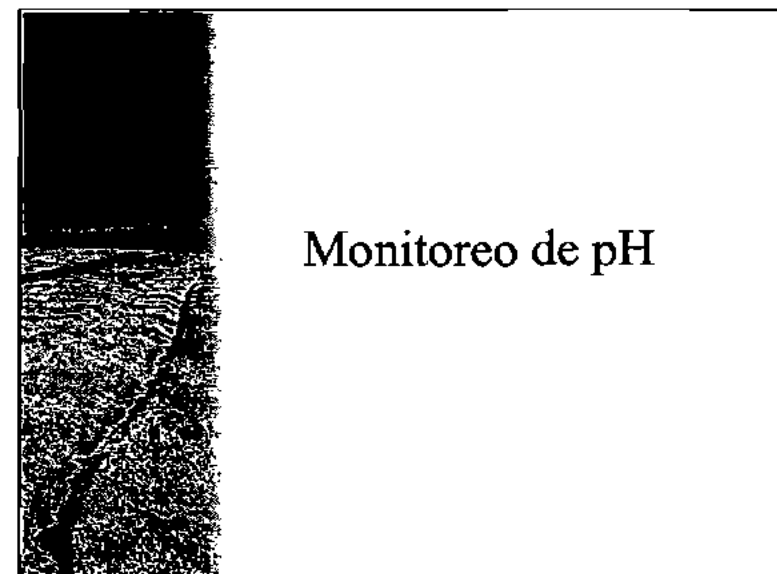
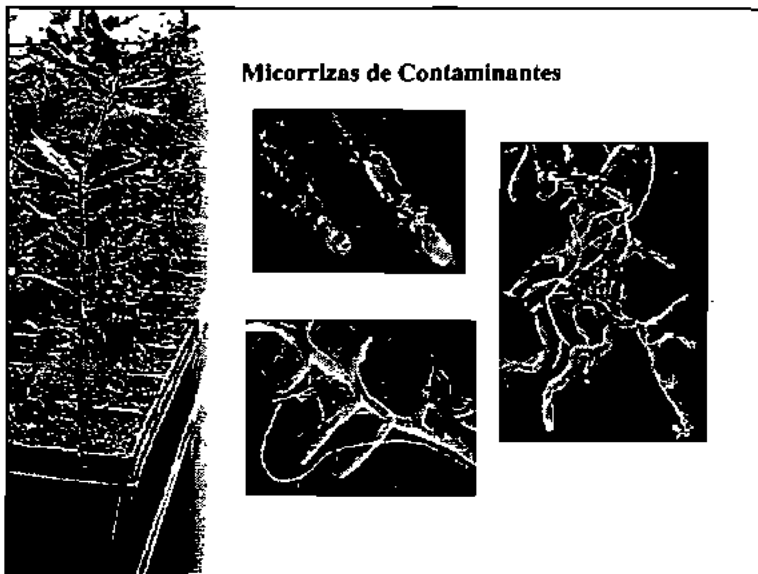
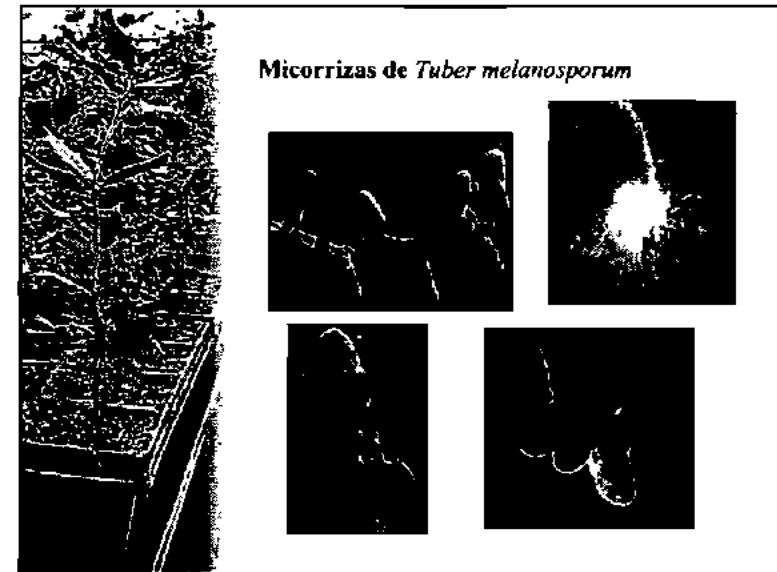
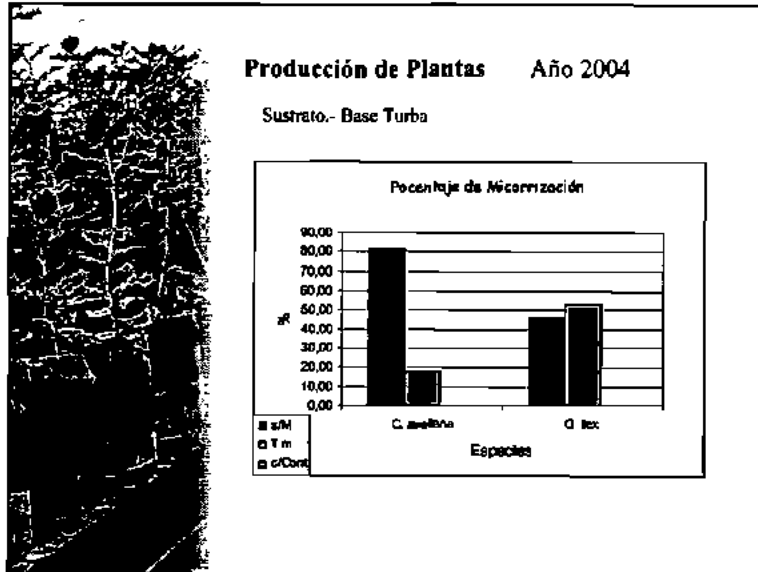
## Producción Planta micorrizada



### Producción de Plantas Año 2003

Sustrato.- Base Tierra





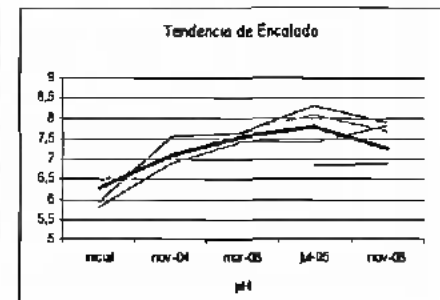


## Monitoreo Predial de pH

| Predio                 | Propietario   | Textura                   | Inicial | Nov-04 | Mar-05 | Jul-05 | Nov-05 |
|------------------------|---------------|---------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| "Rinconada Matense"    | Y. Stannemert | Francisco arcillosa       | 5.94    | 7.58   | 7.63   | 8.31   | 7.81   |
| "El Canelo"            | J. Iracheta   | Francisco arcillo-arenosa | 5.82    | 6.88   | 7.43   | 7.41   | 7.7    |
| "Sta Elena de Chequen" | R. Correa     | Francisco arenosa         | 6.20    | 6.97   | 7.60   | 7.82   | 7.8    |
| "Santa Elisa"          | U.C.M.        | Francisco arcillo-arenosa | 6.45    | 7.04   | 7.68   | 8.08   | 7.7    |
| "Huila Nº 2"           | L. Molina     | Francisco                 | 6.12    | 6.97   | 7.38   | 7.62   | 7.55   |
| "Santa Adela"          | R. Suárez     | Francisco arenosa         | 7.6     | -      | -      | 0.42   | 8.5    |
| "Huallero"             | A. Fajardo    | Francisco                 | 6.2     | -      | -      | 6.83   | 6.88   |
| "San Isidro"           | C. Inabana    | Francisco                 | 6.1     | -      | -      | -      | 6.52   |
| "Chana"                | J. Valenzuela | Francisco                 | 5.8     | -      | -      | -      | 6.58   |

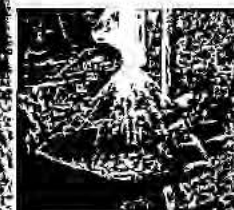
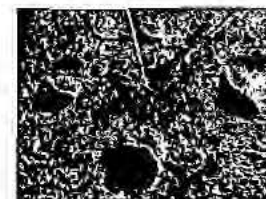
## Tendencia de Encalado

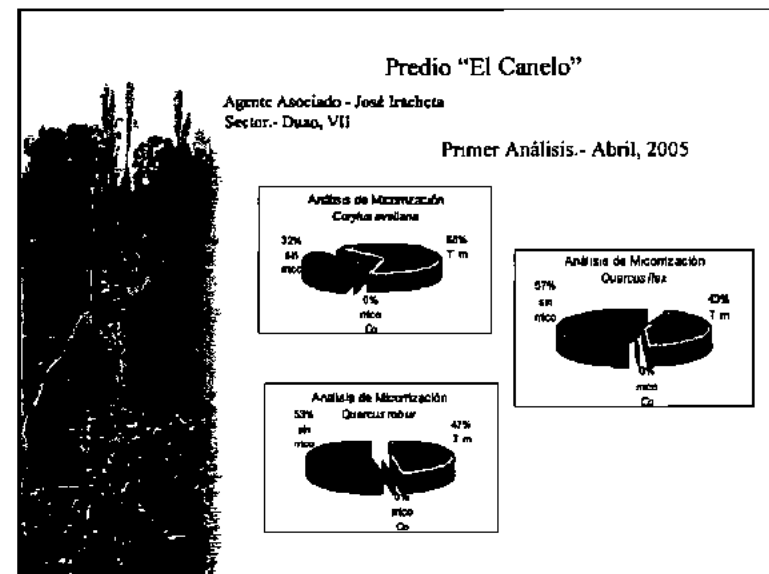
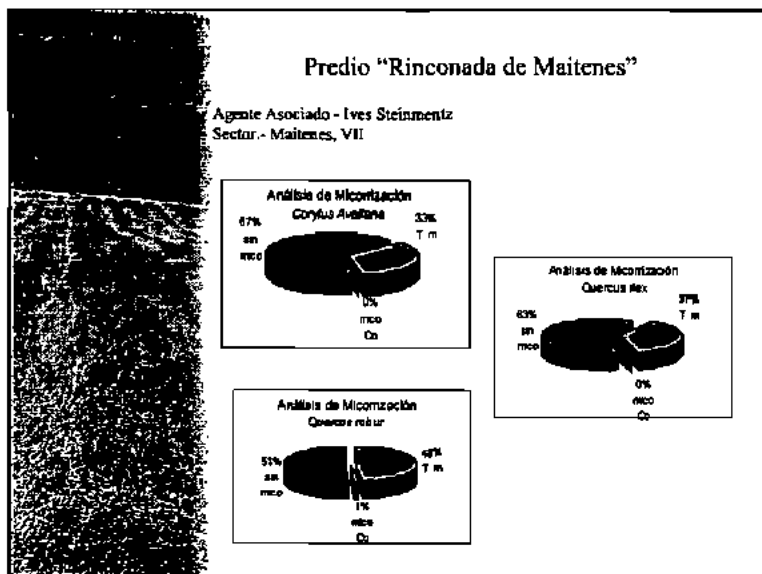
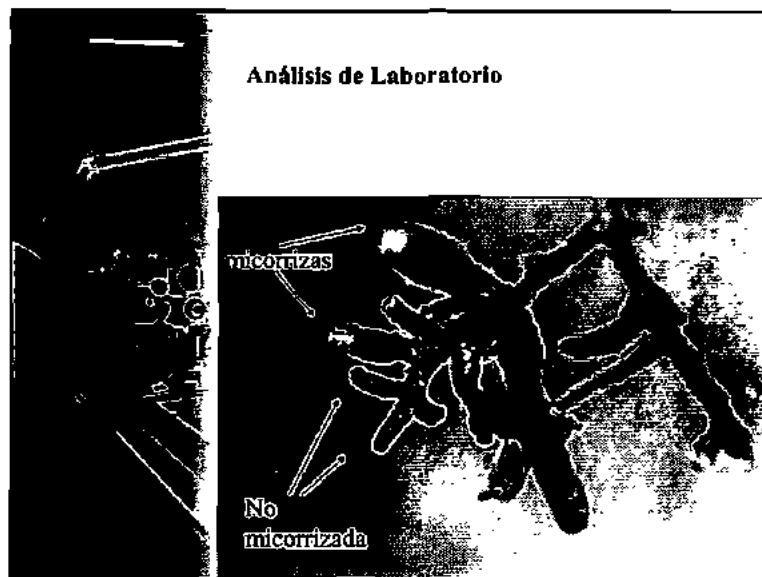
Base: 9 Predios



## Prospección por Predio

## Metodología de muestreo

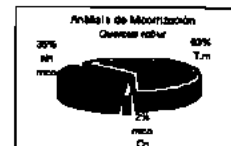
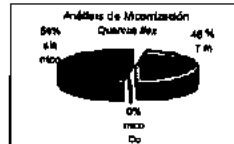
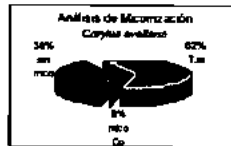




### Predio "El Canelo"

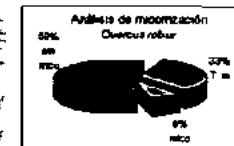
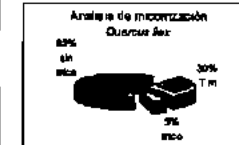
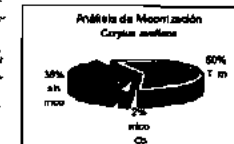
Agente Asociado.- José Iracheta  
Sector.- Duro, VII

Segundo Análisis.- Noviembre, 2005



### Predio "Santa Elena de Chequén"

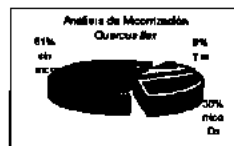
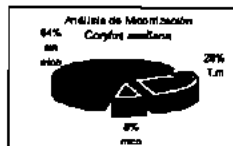
Agente Asociado.- Ruby Correa  
Sector.- Chequén, VII



### Predio "Santa Elisa"

Agente Asociado.- Universidad Católica del Maule  
Sector.- Parral, VII

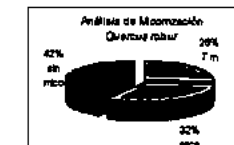
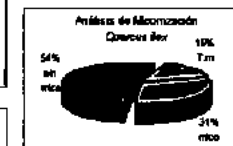
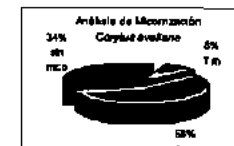
Primer Análisis.- Noviembre, 2004



### Predio "Santa Elisa"

Agente Asociado.- Universidad Católica del Maule  
Sector.- Parral, VII

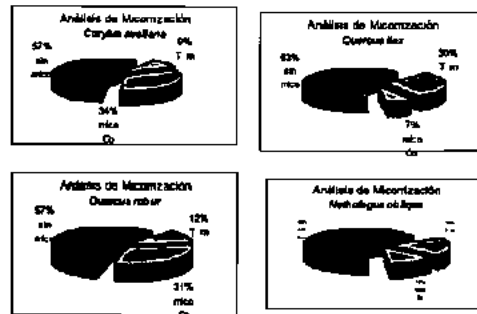
Segundo Análisis.- Noviembre, 2005



### Predio "Hijuela N° 2"

Agente Asociado.- Luis Molina  
Sector.- Chequenleimu, VII

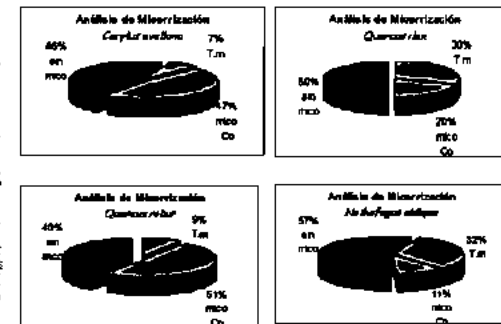
Primer Análisis.- Noviembre, 2004



### Predio "Hijuela N° 2"

Agente Asociado.- Luis Molina  
Sector.- Chequenleimu, VII

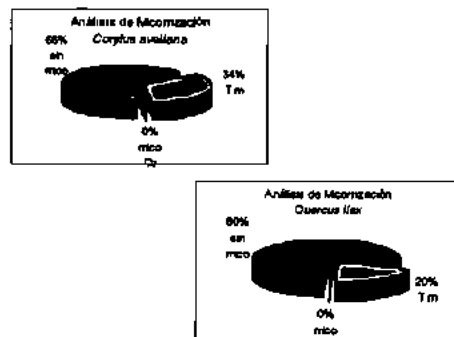
Segundo Análisis.- Septiembre, 2005



### Predio "Santa Adela"

Agente Asociado.- Ricardo Suárez  
Sector.- María Pinto, Metropolitana

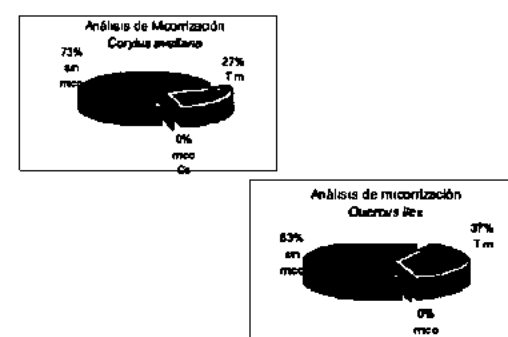
Primer Análisis.- Julio, 2005



### Predio "Santa Adela"

Agente Asociado.- Ricardo Suárez  
Sector.- María Pinto, Metropolitana

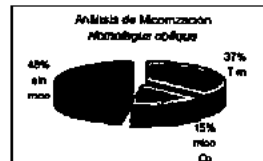
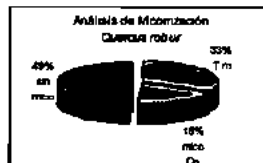
Segundo Análisis.- Diciembre, 2005



### Predio "Fundo Huallerope"

Agente Asociado - Andrew Filshill  
Sector - Pangaipulli, Décima

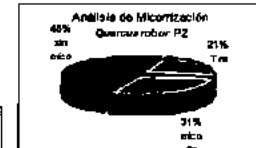
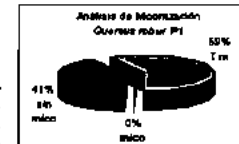
Grafico - Por Especie



### Predio "Fundo Huallerope"

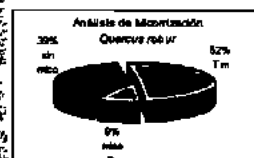
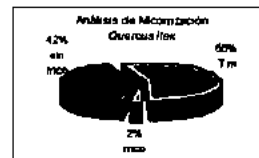
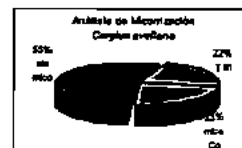
Agente Asociado - Andrew Filshill  
Sector - Pangaipulli, Décima

Grafico - Quercus robur,  
Por Sector



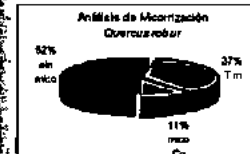
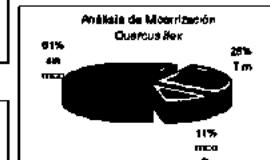
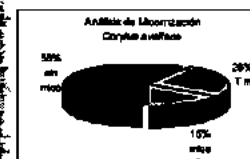
### Predio "San Isidro"

Agente Asociado - Carlos Inbarne  
Sector - La Unión, Décima



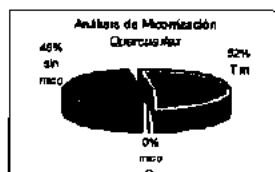
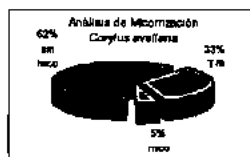
### Predio "Fundo Chainal"

Agente Asociado - Juan Guillermo Valenzuela  
Sector - Matihue, Décima



### Predio "Fundo Baguales"

Agente Asociado - Jacqueline Kleinschuber  
Sector.- Coyhaique, Undécima



### Áreas potenciales para el cultivo de *T. melanosporum*



### Discusión y Conclusiones

- Chile presenta condiciones adecuadas para el cultivo de trufa.
- Las condiciones de suelo y clima de la Zona Central asegurarían el éxito.



## Discusión y Conclusiones

- Las técnicas de inoculación usadas permiten direccionar el trabajo a futuro, para optimizar las condiciones de cultivo



## Discusión y Conclusiones

- Los resultados indican que existe una buena posibilidad para desarrollar el cultivo de trufa en Chile, especialmente con *Quercus ilex*



## Discusión y Conclusiones

- La asociación entre *Nothofagus obliqua* y *Tuber melanosporum* abre nuevas perspectivas de investigación para el cultivo de la trufa



## Discusión y Conclusiones

- La preparación anticipada del sitio es una acción primordial para asegurar un adecuado establecimiento y desarrollo de la trufiera.
- Los cuidados pos-plantación son esenciales para el buen desarrollo del hongo (desmalezado, encalados, riegos, etc.)



## **Discusión y Conclusiones**

- La calidad del agua de riego es fundamental, ya que es uno de los principales carrier de contaminantes.



**¡Muchas Gracias!**





## ANEXO 7.9.

### **PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085**

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

#### Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Andrew Daniel Filshill Silva, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Andrew Daniel Filshill Silva  
Rut :  
Actividad : Agricultor  
Dirección : Presidente Riesco 4210, departamento. 9, Las Condes  
Fono : -----  
Comuna : Santiago  
Región : Metropolitana

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Fundo Huallerope”, esta ubicado en la comuna de Panguipulli, sector al interior de playa Monje, Décima Región y tiene una superficie aproximada de 0,7 ha..

La plantación se estableció en diciembre de 2004, con las especies *Quercus robur* y *Nothofagus obliqua*, micorrizadas con *Tuber melanosporum*, en la Universidad Católica del Maule, y enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca, con un porcentaje de materia orgánica de 15 % y un pH inicial de 6,2.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado mecánico con rastra de discos, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Especie                   | Espaciamento (m) | Cantidad de plantas |
|---------------------------|------------------|---------------------|
| <i>Quercus robur</i>      | 6x6              | 169                 |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 6x6              | 9                   |

La plantación consta con un programa de riego manual localizado a la planta.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Tiene dos mediciones de pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

Se realizó un encalado general dentro de toda la superficie de establecimiento de la trufera, incorporando luego una capa de conchuela molida, localizado a la taza de la planta.

| Mediciones de pH |            |            |
|------------------|------------|------------|
| Fecha            | Parte Alta | Parte Baja |
| Ago - 05         | 6.83       |            |
| Nov - 04         | 7.19       | 6.58       |

El muestreo de raíces se realizó en Diciembre del año 2005, dividiendo el predio en tres parcelas, correspondientes a la topografía del lugar.

Parcela 1.- Parte alta, superior

Parcela 2.- Parte alta, inferior

Parcela 3.- Parte baja

Las muestras obtenidas por parcela correspondiente a cada especie.

| Especies                  | Nº de plantas por especie |           |           |
|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
|                           | Parcela 1                 | Parcela 2 | Parcela 3 |
| <i>Quercus robur</i>      | 4                         | 3         | 5         |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 0                         | 0         | 3         |



Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

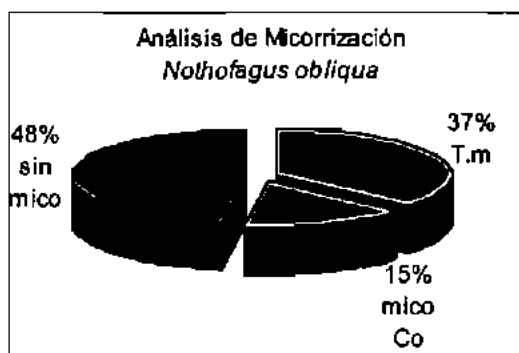
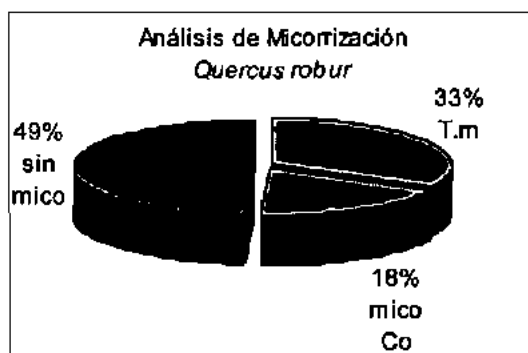
La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍFICO

### 1.- Porcentaje de micorrización por especie

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                 |                   |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE         |                   |
|                             | <i>Q. robur</i> | <i>N. obliqua</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 33%             | 37%               |
| Con otras micorrizas        | 18%             | 15%               |
| Sin micorrizas              | 49%             | 48%               |
| TOTAL                       | 100%            | 100%              |



Las series corresponden a:

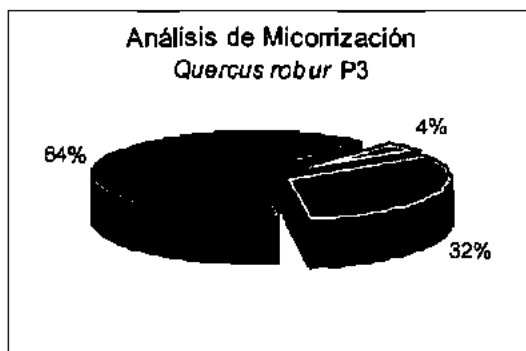
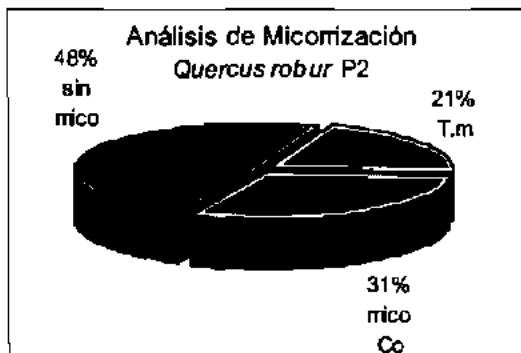
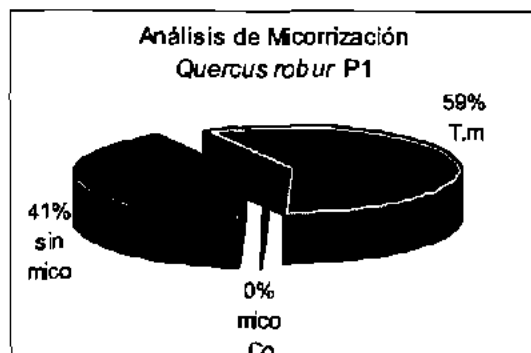
sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## 2.- Porcentaje de micorrización por parcela para la especie *Quercus robur*

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                            |         |      |      |
|-----------------------------|----------------------------|---------|------|------|
| Especie                     | Micorrizas                 | PARCELA |      |      |
|                             |                            | Nº 1    | Nº 2 | Nº 3 |
| <i>Quercus robur</i>        | Con <i>T. melanosporum</i> | 59%     | 21%  | 4%   |
|                             | Con otras micorrizas       | 0%      | 31%  | 32%  |
|                             | Sin micorrizas             | 41%     | 48%  | 64%  |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES.-**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad y territorialidad de las especies invasoras. No obstante, en el presente no se muestran como un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

*Nothofagus obliqua* se presenta con un óptimo desarrollo fisiológico y niveles de micorrización comparables con los fitosimbiontes naturales de *Tuber melanosporum*, resultados que seducen y orientan a esta especie como un potencial productor de este hongo para terrenos de la zona centro-sur de nuestro país.

La diferencia en la calidad de la micorrización entre ambos sectores se debe a la presencia de robles nativos en los deslindes de la trufera, sin dejar de mencionar algunos abedules que bordeaban el camino que divide a las parcelas 1 y 2.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

**“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario ”.**

**Fecha de Inicio:** noviembre 2001  
**Fecha de Término:** diciembre 2005

**Participantes del Proyecto:**

**Ejecutor:** Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
**Asociado:** Luis Molina Torres, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Luis Gilberto Molina Torres  
Rut :  
Actividad : Agricultor  
Dirección : Kilómetro 25.6 camino Curico-Chequenlemu S/N  
Fono : -----  
Comuna : Los Niches, Curicó.  
Región : Séptima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Hijuela N° 2, Chequenlemu”, esta ubicado en la comuna de Los Niches, en la precordillera de Curico.

La trufera tiene una superficie de 1 ha, y fue establecida en la primavera 2003, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex*, *Quercus robur* y *Nothofagus obliqua*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcada bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca, con un porcentaje de materia orgánica de 3,64 % y un pH inicial de 6,12.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado químico con el ingrediente activo glifosato, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizo a superficie completa, la incorporación de la cal se realizo con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confecciono una casilla de 40x40x65 cm.

La plantas fueron rodeadas por una malla protectora, para evitar el ataque de lagomorfos.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie. El espaciamiento entre las hileras fue de 5 m.

| Especie                   | Espaciamiento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 6                              | 130                 |
| <i>Quercus robur</i>      | 7                              | 85                  |
| <i>Corylus avellana</i>   | 4                              | 50                  |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 7                              | 18                  |



La plantación consta con un sistema de riego manual localizado a la planta. El agua con que es regada la trufera proviene de un canal de riego.

En otoño 2005 se realiza un encalado correctivo de 4,5 kg/pl, lo cual ayudo a elevar el pH.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

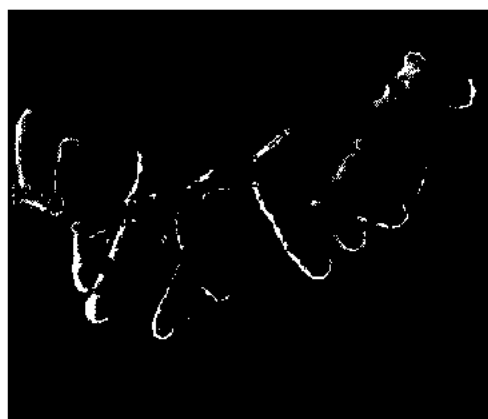
Se ha monitoreado en forma periódica el pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

Se realizo un encalado general dentro de toda la superficie de establecimiento de la trufera, incorporando luego un encalado localizado a la taza de la planta, en un radio de acción de 1.5 m.

| Mediciones de pH |          |
|------------------|----------|
| Fecha            | Promedio |
| Abr-03           | 6,12     |
| Sep-03           | 7,40     |
| Ago - 04         | 7,03     |
| Nov - 04         | 7,00     |
| Mar - 05         | 7,38     |
| Jul - 05         | 7,58     |
| tasa Jul-05      | 8,03     |
| Nov -05          | 7,55     |
| tasa Nov -05     | 8,02     |

El muestreo de raíces se realizó en Noviembre del año 2004, evaluando dos plantas por especie, seleccionadas al azar, para las tres parcelas en las que fue dividido el predio.

En septiembre de 2005 se realizó un nuevo muestreo.



Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

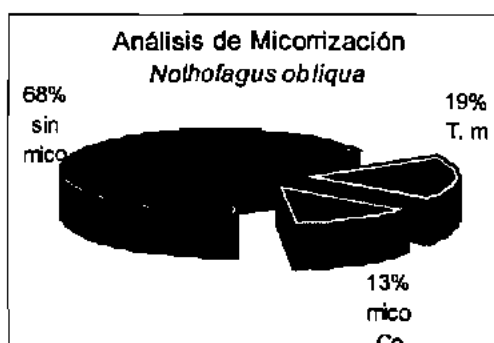
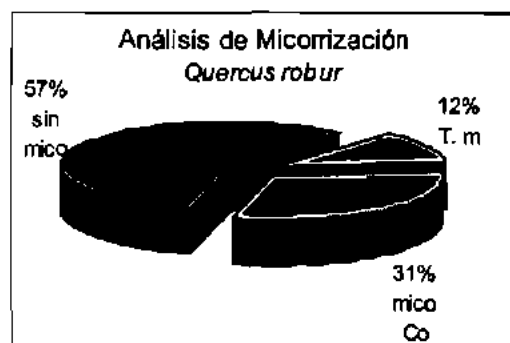
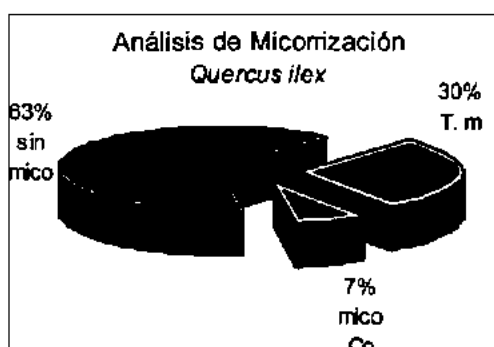
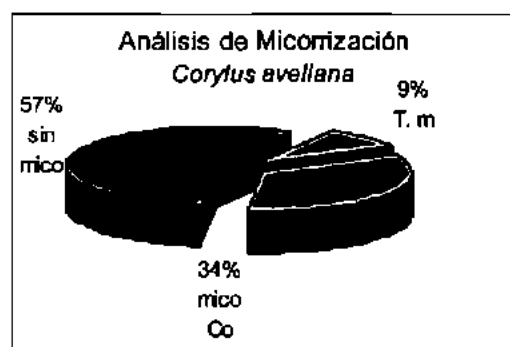
La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCICO

Primer análisis.- Noviembre, 2004

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |                   |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |                   |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> | <i>N. obliqua</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 9%                 | 30%            | 12%             | 19%               |
| Con otras micorrizas        | 34%                | 7%             | 31%             | 13%               |
| Sin micorrizas              | 57%                | 63%            | 57%             | 68%               |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            | 100%              |



Las series corresponden a:

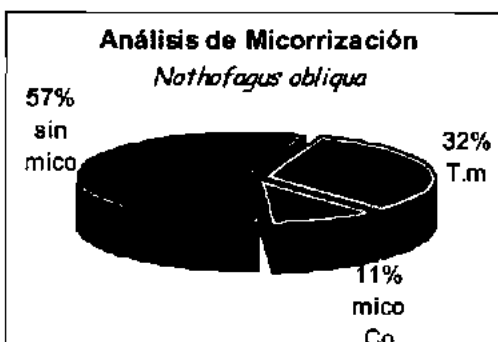
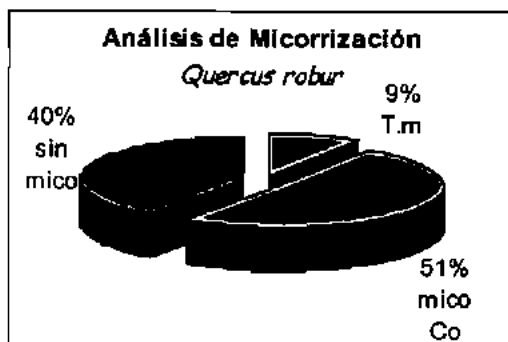
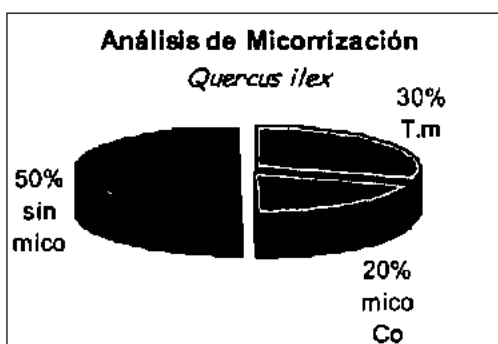
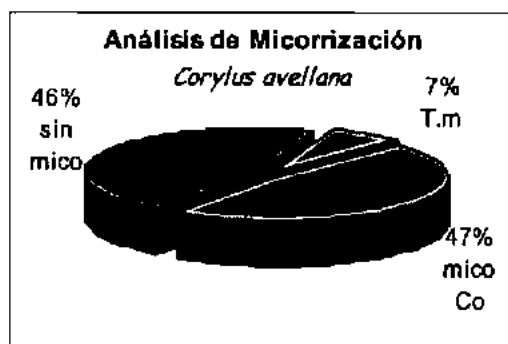
sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## Segundo análisis.- Septiembre 2005

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |                   |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |                   |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> | <i>N. obliqua</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 7%                 | 30%            | 9%              | 32%               |
| Con otras micorrizas        | 47%                | 20%            | 51%             | 11%               |
| Sin micorrizas              | 46%                | 50%            | 40%             | 57%               |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            | 100%              |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES.-**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies *Quercus ilex* y *Nothofagus obliqua*, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, orientadas principalmente a las especies *Corylus avellana* y *Quercus robur*, considerando la competitividad de la especie invasora. La agresividad de esta especie a desplazado significativamente el espacio de *Tuber melanosporum*, no obstante, con la enmienda aplicada a la taza de la planta se espera disminuir su desarrollo.

*Nothofagus obliqua* se presenta con un óptimo desarrollo fisiológico y niveles de micorrización comparables con los fitosimbiontes naturales de *Tuber melanosporum*, resultados que seducen y orientan a esta especie como un potencial productor de este hongo para terrenos de la zona centro-sur de nuestro país.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

***PROYECTO FIA-PI-C-200I-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario ”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Ruby Correa Pozo, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Ruby Correa Pozo  
Rut :  
Actividad : Agricultor  
Dirección : Fundo Santa Elena de Chequén S/N, San Clemente.  
Fono : -----  
Comuna : San Clemente.  
Región : Séptima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Santa Elena de Chequén”, esta ubicado en la comuna de San Clemente, sector Duao y tiene una superficie de 1 ha..

La plantación se estableció en agosto–septiembre de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcada bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franco arenoso, con un porcentaje de materia orgánica de 5.65 % y un pH inicial de 6,20.

### PRACTICAS CULTURALES

Antes de la plantación se trabajo el suelo con arado de cincel para mejorar la aireación y controlar malezas. También se realizo un control químico de las malezas antes del establecimiento de la trufiera.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Especie                 | Espaciamiento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 6                              | 198                 |
| <i>Quercus robur</i>    | 7                              | 72                  |
| <i>Corylus avellana</i> | 4                              | 60                  |

La plantación consta con un sistema de riego manual localizado a la planta, el agua con que se riega esta trufiera es de vertientes superficiales de primer orden.

Se han realizado controles de malezas trimestralmente.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Se ha monitoreado en forma periódica el pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

Se realizó un encalado general dentro de toda la superficie de establecimiento de la trufera, incorporando luego un encalado localizado a la taza de la planta, con la aplicación de cal iansa.

| Mediciones de pH |                      |                      |                    |
|------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Fecha            | Promedio Sector alto | Promedio Sector bajo | Promedio Cal iansa |
| Ago - 04         | 6.96                 |                      |                    |
| Nov - 04         | 6.97                 |                      |                    |
| Mar - 05         | 7.60                 |                      |                    |
| Jul - 05         | 7.82                 | 7.37                 | 7.23               |
| Nov-05           | 7.7                  | 7.3                  | 7.1                |

El muestreo de raíces se realizó en julio-agosto del año 2005, para las tres parcelas en las que fue dividido el predio, la división parcelar correspondió a la topografía del lugar.

Parcela 1.- Parte alta

Parcela 2.- Parte baja, hasta división del canal.

Parcela 3.- Cal iansa

Las muestras obtenidas por parcela correspondiente a cada especie.

| Especies                | N° de plantas por especie |           |           |
|-------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
|                         | Parcela 1                 | Parcela 2 | Parcela 3 |
| <i>Quercus ilex</i>     | 3                         | 3         | 3         |
| <i>Quercus robur</i>    | 2                         | 1         | 1         |
| <i>Corylus avellana</i> | 3                         | 0         | 0         |



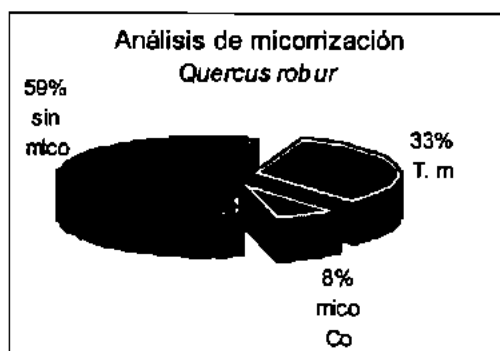
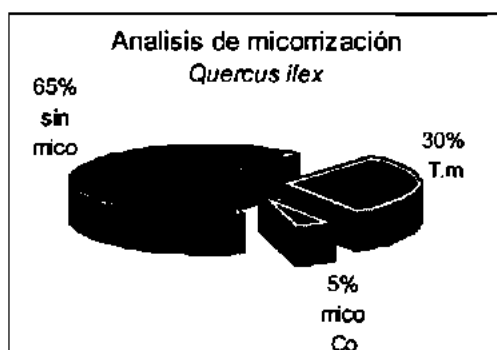
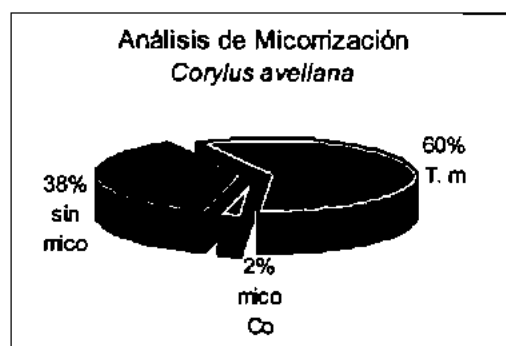
Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCICO

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 60%                | 30%            | 33%             |
| Con otras micorrizas        | 2%                 | 5%             | 8%              |
| Sin micorrizas              | 38%                | 65%            | 59%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*



## **OBSERVACIONES.-**

El análisis para cada parcelar en la que fue dividido el predio, no arrojó diferencias significativas por lo que los resultados han sido presentados por especie, incluyendo todas las muestras evaluadas.

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad de la especie invasora. No obstante, a la fecha de muestreo, no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario ”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001

Fecha de Término: diciembre 2005

Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Asociado: Yves Paul Steinmetz, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Yves Paul Steinmetz  
Rut :  
Actividad : Empresario agrícola  
Dirección : Villa Esmeralda Sur Parcela F, Talca  
Fono :  
Comuna : Talca  
Región : Séptima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Rinconada Maitenes”, esta ubicado en la comuna de San Clemente y tiene una superficie de 1 ha..

La plantación se estableció en agosto–septiembre de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum*, producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca arcillosos, con un porcentaje de materia orgánica de 2.11 % y un pH inicial de 5.94.

### PRACTICAS CULTURALES

Antes de la plantación se trabajo el suelo con arado de discos para mejorar la aireación y controlar malezas.

El encalado se realizo a superficie completa, la incorporación de la cal se realizo con rastra de discos 6 meses antes de la plantación

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Especie            | Espaciamento | Cantidad plantas | Superficie (ha) |
|--------------------|--------------|------------------|-----------------|
| <i>Q. ilex</i>     | 5x6          | 187              | 0,561           |
| <i>Q. robur</i>    | 5x7          | 66               | 0,231           |
| <i>C. avellana</i> | 5x4          | 15               | 0,03            |
| Total              |              | 268              | 0,822           |

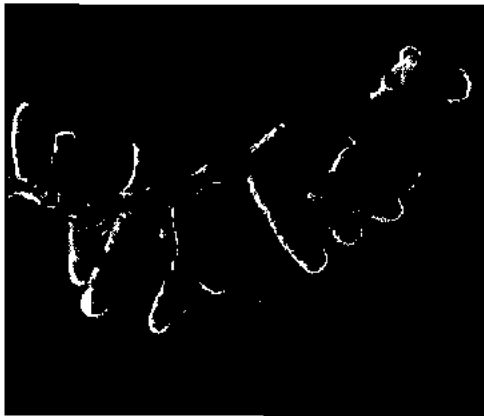
La plantación consta con un sistema de riego manual localizado a la planta y el agua que abastece a la trufera es de vertiente.

**EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN**

Se ha monitoreado en forma periódica el pH de cada unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Medición de pH |          |
|----------------|----------|
| Fecha          | Promedio |
| Ago - 04       | 7.35     |
| Nov - 04       | 7.56     |
| Mar - 05       | 7,63     |
| Jul - 05       | 8.31     |
| Nov - 05       | 7.91     |

El muestreo de raíces se realizó en Abril del año 2005, evaluando dos plantas por especie, seleccionadas al azar, para las tres parcelas en las que fue dividido el predio.



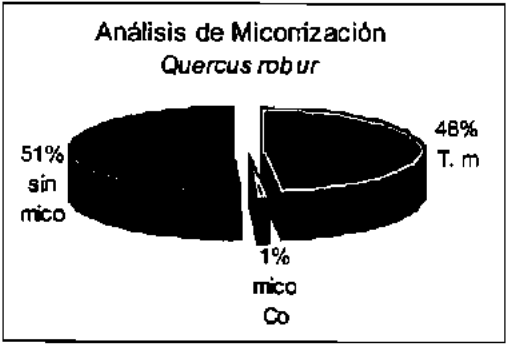
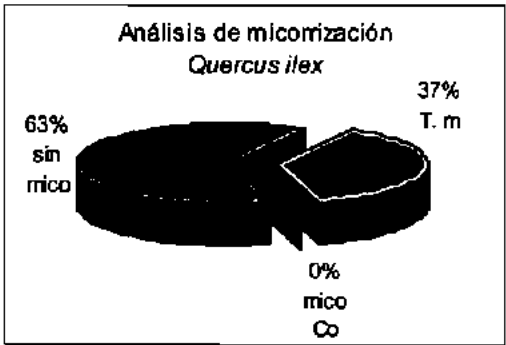
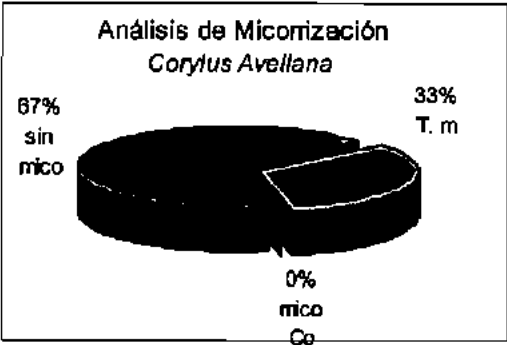
Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCICO

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |             |         |          |
|-----------------------------|-------------|---------|----------|
| Micorrizas                  | ESPECIE     |         |          |
|                             | C. avellana | Q. ilex | Q. robur |
| Con T. melanosporum         | 33%         | 37%     | 48%      |
| Con otras micorrizas        | 0%          | 0%      | 1%       |
| Sin micorrizas              | 67%         | 63%     | 51%      |
| TOTAL                       | 100%        | 100%    | 100%     |



Las series corresponden a:

- sin mico.- Ápices sin micorrizas.
- mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.
- mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad de la especie invasora. No obstante, el porcentaje de micorrización es poco significativo y a la fecha de muestreo no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

### ***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

#### Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Carlos Iribarne Oñate, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre del propietario : Carlos Iribarne Oñate  
RUT :  
Actividad : Empresario  
Dirección : Fundo San Isidro S/N  
Comuna : La Unión  
Región : Décima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Fundo San Isidro”, esta ubicado en la comuna de La Unión.

La plantación se estableció en noviembre de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Q. robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum*, producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcada bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura Franca y un pH inicial de 6,2

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado mecánico, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizó a superficie completa, la incorporación de la cal se realizó con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confeccionó una casilla de 30x30x30 cm.

Las plantas fueron rodeadas por una malla protectora, para evitar el ataque de lagomorfos.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Espece                  | Espaciamento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 6                             | 62                  |
| <i>Quercus robur</i>    | 7                             | 63                  |
| <i>Corylus avellana</i> | 5                             | 57                  |

La plantación consta con un sistema de riego manual localizado a la planta.



## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Tiene dos mediciones de pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Mediciones de pH |          |
|------------------|----------|
| Fecha            | Promedio |
| Sep - 05         | 6.8      |
| Nov - 05         | 6.52     |

El muestreo de raíces se realizó en Diciembre del año 2005, monitoreando un total de 10 plantas por especie, para la superficie total del predio.



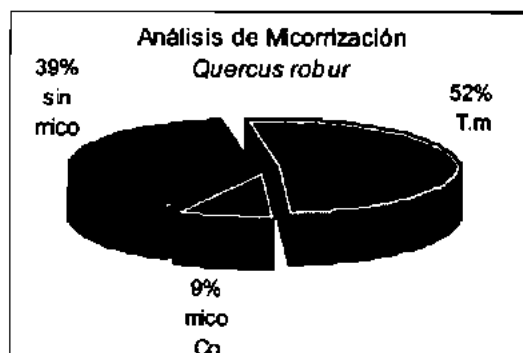
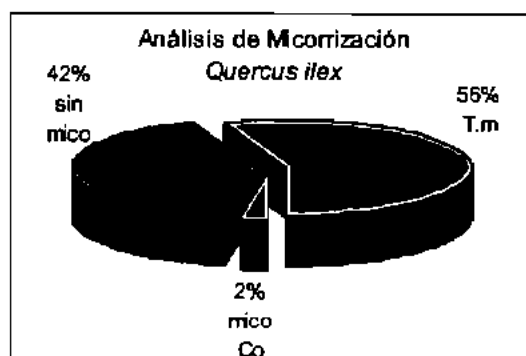
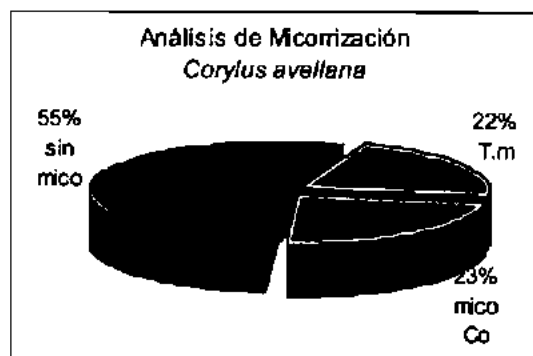
Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCIO

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 22%                | 56%            | 52%             |
| Con otras micorrizas        | 23%                | 2%             | 9%              |
| Sin micorrizas              | 55%                | 42%            | 39%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES.-**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseada es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad y territorialidad de las especies invasoras. No obstante, a la fecha de muestreo no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

No podemos dejar de mencionar que al establecimiento de la trufera se le aconseja al propietario construir una zanja trinchera para aislar la misma de una hilera de *Nothofagus obliqua*. Por lo cual creemos que la fuerte contaminación que sufre *C. avellana* es debido a estos.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Sociedad Agrícola Rio Chepu Ltda., Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre del propietario : Sociedad Agrícola Rio Chepu Ltda.  
RUT :  
Representante Legal : Juan Guillermo Valenzuela Bosinovic  
RUT :  
Actividad : Empresario  
Dirección : Fundo Chainal S/N Malalhue, Lanco  
Comuna : Lanco  
Región : Décima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Fundo Chainal”, esta ubicado en la comuna de Lanco, sector Malalhue y tiene una superficie de 1 ha..

La plantación se estableció en Noviembre de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca, con un porcentaje de materia orgánica de 15 % y un pH inicial de 5.8.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado mecánico con rastra de discos, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizó a superficie completa, la incorporación de la cal se realizó con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confeccionó una casilla de 30x30x30 cm.

Las plantas fueron rodeadas por una malla protectora, para evitar el ataque de lagomorfos.

En cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Especie                 | Espaciamiento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 5x6                            | 102                 |
| <i>Quercus robur</i>    | 5x7                            | 139                 |
| <i>Corylus avellana</i> | 5x5                            | 49                  |

La plantación consta con un programa de riego manual localizado a la planta.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Tiene una medición de pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Mediciones de pH |          |
|------------------|----------|
| Fecha            | Promedio |
| Mar- 04          | 5,8      |
| Nov - 05         | 6.58     |

El muestreo de raíces se realizó en Diciembre del año 2005, monitoreando un total de 10 plantas por especie, para la superficie total del predio.



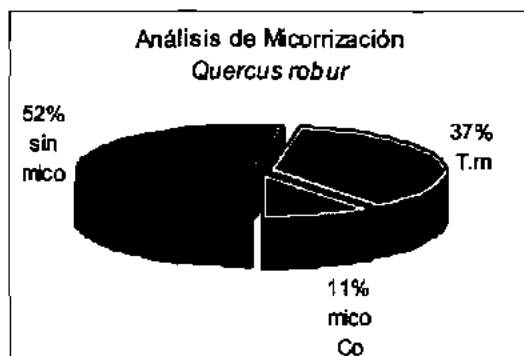
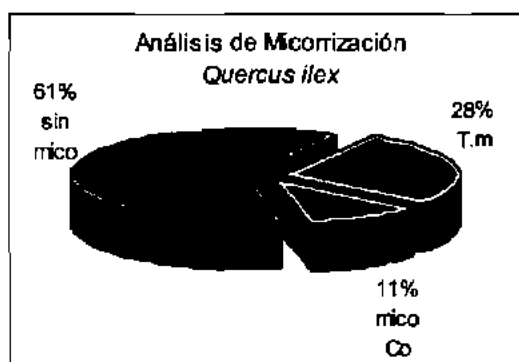
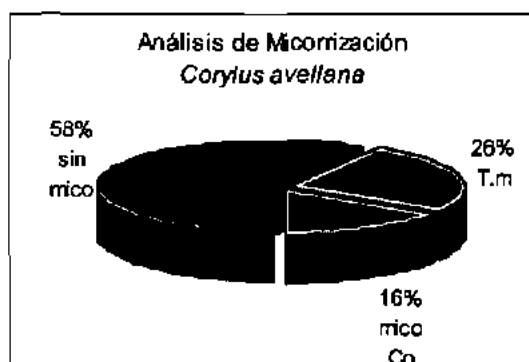
Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCIO

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 26%                | 28%            | 37%             |
| Con otras micorrizas        | 16%                | 11%            | 11%             |
| Sin micorrizas              | 58%                | 61%            | 52%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES.-**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no desecadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad y territorialidad de las especies invasoras. No obstante, a la fecha de muestreo no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524





GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

### ***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario ”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

#### Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Salmones Colbún Ltda., Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre Empresa : Salmenes Colbún Ltda.  
Rut empresa :  
Representante legal : José Arturo Iracheta Cartes  
Dirección : 2 Sur 665 Depto. 1009, Talca  
Fono :  
Comuna : Maule  
Región : Séptima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “El Canelo”, esta ubicado en la comuna de Maule, en la ruta que une Talca – Duao y tiene una superficie de 1 ha..

La plantación se estableció en julio y agosto de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franco arcillo-arenosa, con un porcentaje de materia orgánica de 2,09 % y un pH inicial de 5,82.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado mecánico con rastra de discos, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizo a superficie completa, la incorporación de la cal se realizo con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confecciono una casilla de 30x30x30 cm.

La plantas fueron rodeadas por una malla protectora, para evitar el ataque de lagomorfos.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie. El marco de plantación se estableció en rectángulos, con el propósito de homogenizar la distribución de la plantación.

| Especie            | Espaciamento | Cantidad plantas | Superficie (ha) |
|--------------------|--------------|------------------|-----------------|
| <i>Q. ilex</i>     | 6x6          | 198              | 0,71            |
| <i>Q. robur</i>    | 6x7          | 72               | 0,3             |
| <i>C. avellana</i> | 6x4          | 60               | 0,14            |
| Total              |              | 330              | 1,15            |

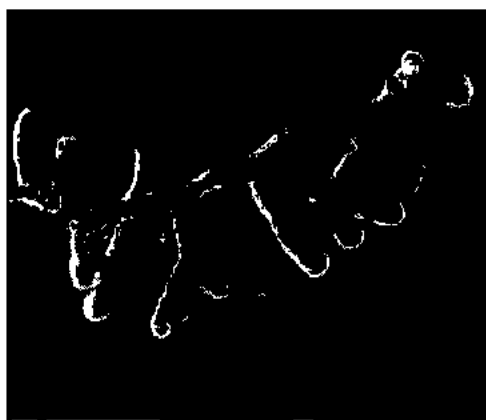
La plantación consta con un sistema de riego por micro aspersión localizado a la planta. El agua utilizada para el riego proviene de pozos profundos con pH de 7,4.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Se ha monitoreado en forma periódica el pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Medición de pH |          |
|----------------|----------|
| Fecha          | Promedio |
| Ago - 04       | 6,63     |
| Nov - 04       | 6,88     |
| Mar - 05       | 7,43     |
| Jul - 05       | 7,41     |
| Nov - 05       | 7,40     |

El muestreo de raíces se realizó en dos periodos, en otoño (abril) y primavera (noviembre) de 2005, evaluando dos plantas por especie, seleccionadas al azar, para las tres parcelas en las que fue dividido el predio.



Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

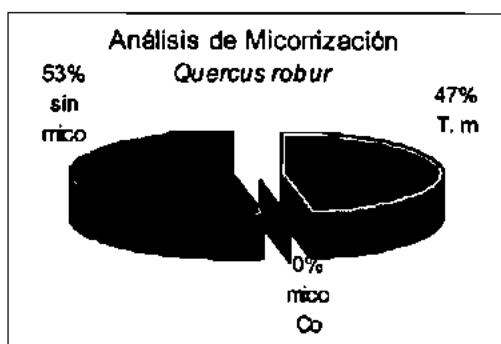
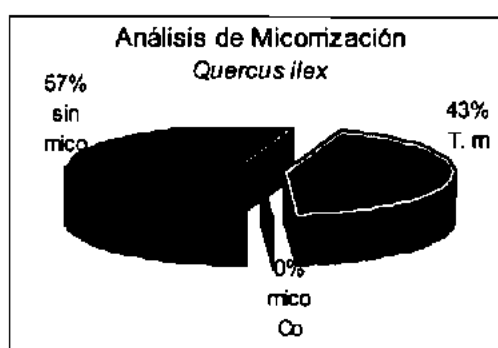
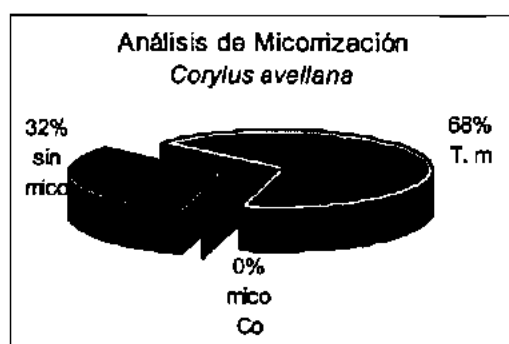
La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍFICO

Primer análisis.- Abril, 2005

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 68%                | 43%            | 47%             |
| Con otras micorrizas        | 0%                 | 0%             | 0%              |
| Sin micorrizas              | 32%                | 57%            | 53%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

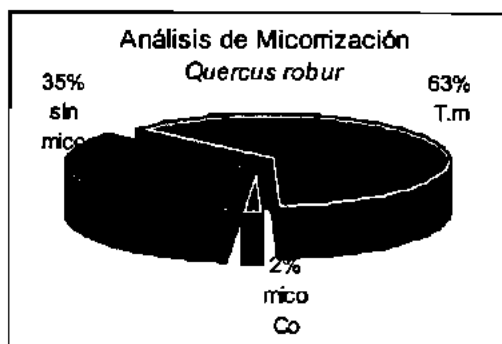
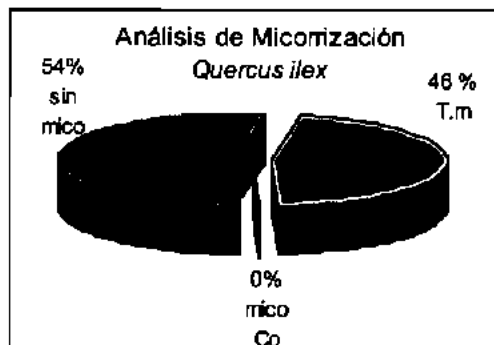
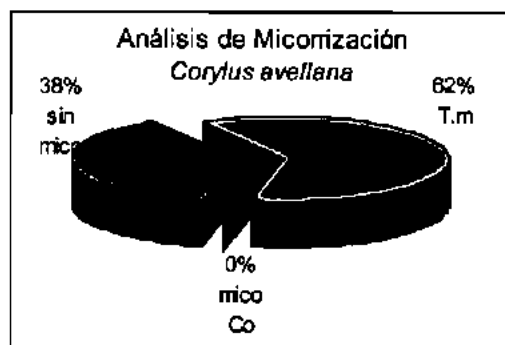
sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

Mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

**Segundo análisis.-** Noviembre, 2005

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 62%                | 46%            | 63%             |
| Con otras micorrizas        | 0%                 | 0%             | 2%              |
| Sin micorrizas              | 38%                | 54%            | 35%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

Mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad de la especie invasora. No obstante, el porcentaje de micorrización es poco significativo y a la fecha de muestreo no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

### ***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

#### **Participantes del Proyecto:**

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Jaqueline Kleinsteuber Wilson, Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Jaqueline Kleinsteuber Wilson  
Rut :  
Actividad :  
Dirección : Errázuriz N°731, Coyhaique  
Fono :  
Comuna : Coyhaique  
Región : Undécima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Fundo Baguales”, esta ubicado en la comuna de Coyhaique, sector Alto Baguales y tiene una superficie aproximada de 1 ha..

La plantación se estableció en noviembre de 2004, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum*, producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura Franca, con un pH inicial de 6,1.

### PRACTICAS CULTURALES

Antes de la plantación se trabajo el suelo con arado de discos para mejorar la aireación y controlar malezas.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie. Distancia entre hileras 6 m.

| Especie                 | Espaciamiento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 6                              | 210                 |
| <i>Corylus avellana</i> | 4                              | 99                  |

La plantación consta con un sistema de riego manual localizado a la planta.

Se han realizado controles de malezas trimestralmente.

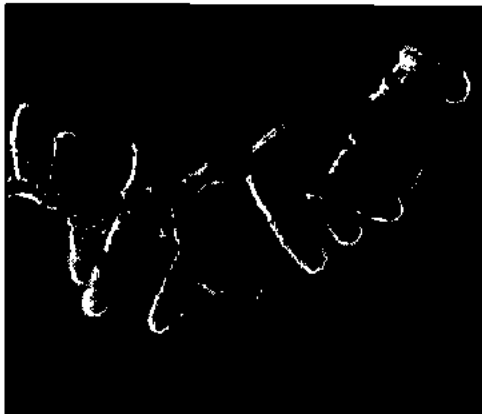


## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Tiene 2 medición de pH la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Mediciones de pH |          |
|------------------|----------|
| Fecha            | Promedio |
| febrero - 04     | 6.1      |
| septiembre - 04  | 7.1      |
| Diciembre-05     | 7.2      |

El muestreo de raíces se realizó en Diciembre de 2005, monitoreando 10 plantas para la especie *Quercus ilex* y 8 plantas en *Corylus avellana*.



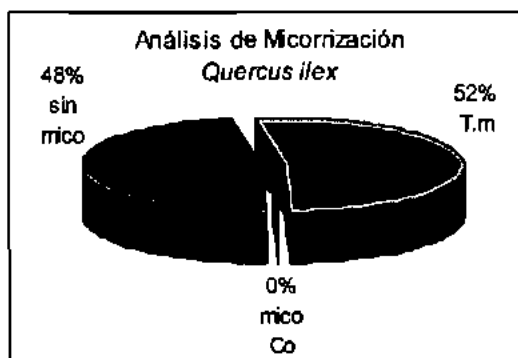
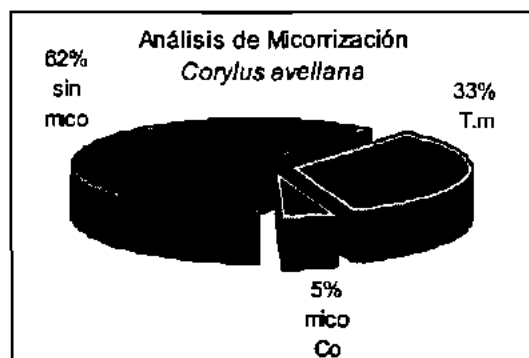
Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCIO

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |
|-----------------------------|--------------------|----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 33%                | 52%            |
| Con otras micorrizas        | 5%                 | 0%             |
| Sin micorrizas              | 62%                | 48%            |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES.-**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con las especies establecidas, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

El porcentaje de ápices sin micorrizar, en *Corylus avellana*, esta representado por una significativa proporción de raicillas nuevas, reflejando el acelerado desarrollo radical que esta presentando esta especie en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, considerando la competitividad de la especie invasora. No obstante, el porcentaje de micorrización es poco significativo y a la fecha de muestreo no son un factor crítico en el desarrollo de *Tuber melanosporum*.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Sociedad Agrícola Río Puelo Ltda., Chile.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre del propietario : Sociedad Agrícola Río puelo Ltda.  
RUT :  
Representante Legal : Manuel Palma Villarroel  
RUT :  
Actividad : Empresario  
Dirección : Parcela Piwuchen S/N, sector La Poza, La Unión  
Comuna : La Unión  
Región : Décima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Parcela Piwuchen”, esta ubicado en la comuna de La Unión, sector La Pza y tiene una superficie de 1 ha..

La plantación se estableció en diciembre 2005, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* . Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca, con un pH inicial de 5.8.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado mecánico con rastra de discos, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizo a superficie completa, la incorporación de la cal se realizo con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confecciono una casilla de 30x30x30 cm.

En cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie.

| Especie                 | Espaciamento (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 6x6              | 192                 |
| <i>Corylus avellana</i> | 6x4              | 12                  |

La plantación consta con un programa de riego manual localizado a la planta.

## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Tiene una medición de pH de la unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

| Mediciones de pH |          |
|------------------|----------|
| Fecha            | Promedio |
| Mar- 04          | 5,8      |
| Dic- 05          | 5,81     |

### ***CONTACTOS:***

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

### ***PROYECTO FIA-PI-C-2001-A-085***

“Truficultura. Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario”.

Fecha de Inicio: noviembre 2001  
Fecha de Término: diciembre 2005

#### Participantes del Proyecto:

Ejecutor: Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Asociado: Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España.

## RESUMEN EJECUTIVO

### PROPIETARIO

Nombre propietario : Universidad Católica del Maule  
Rut :  
Actividad : Educación  
Dirección : Avenida San Miguel 3605, Talca.  
Fono :  
Comuna : Talca  
Región : Séptima

### ASPECTOS GENERALES DEL PREDIO

La unidad experimental “Santa Elisa”, esta ubicado en la comuna de Parral y tiene una superficie de 0,5 ha..

La plantación se estableció en octubre de 2003, con las especies *Corylus avellana*, *Quercus ilex* y *Quercus robur*. Se utilizaron plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum*, producidas en la Universidad Católica del Maule, enmarcadas bajo el proyecto FIA-PI-C-2001-A-085.

El suelo es de textura franca arcillo arenoso, con un porcentaje de materia orgánica de 4,1% y un pH inicial de 6,45.

### PRACTICAS CULTURALES

Se realizó un desmalezado químico con el ingrediente activo glifosato, debido a la gran abundancia y agresividad de las malezas presentes dentro del predio.

El encalado se realizo a superficie completa, la incorporación de la cal se realizo con rastra de discos 6 meses antes de la plantación. En el establecimiento de la trufera se confecciono una casilla de 40x40x65 cm.

La plantas fueron rodeadas por una malla protectora, para evitar el ataque de lagomorfos.

Las líneas de plantación se establecieron orientadas al norte, en cada línea de plantación se marcó la posición de cada planta y su distanciamiento dependió de cada especie. El espaciamento entre las hileras fue de 6 m.

| Especie                 | Espaciamento en la hilera (m) | Cantidad de plantas |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>Quercus ilex</i>     | 6                             | 52                  |
| <i>Quercus robur</i>    | 7                             | 42                  |
| <i>Corylus avellana</i> | 4                             | 26                  |



La plantación consta con un sistema de riego por goteo a la planta. El agua con que es regada la trufera proviene de un canal de riego.

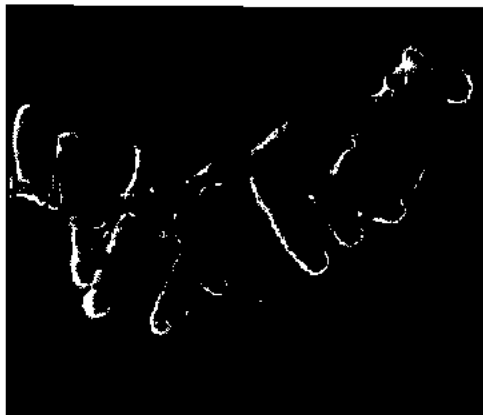
## EVALUACIÓN DE LA PLANTACIÓN

Se ha monitoreado en forma periódica el pH de cada unidad experimental. Esto con la finalidad de evaluar el comportamiento de este parámetro, a modo de aportar información para una mejor toma de decisiones en la planificación a corto y mediano plazo.

Se realizó un encalado general dentro de toda la superficie de establecimiento de la trufera.

| Medición de pH |      |
|----------------|------|
| Fecha          | pH   |
| Ago - 04       | 6.63 |
| Nov - 04       | 7.04 |
| Mar - 05       | 7.69 |
| Jul - 05       | 8.03 |
| Nov - 05       | 7.70 |

El muestreo de raíces se realizó en dos periodos, en primavera (noviembre) del año 2004 y en primavera (noviembre) del presente año, evaluando dos plantas por especie, seleccionadas al azar, para las tres parcelas en las que fue dividido el predio.



Cada planta fue muestreada según sus puntos cardinales, obteniendo cuatro muestras por planta.

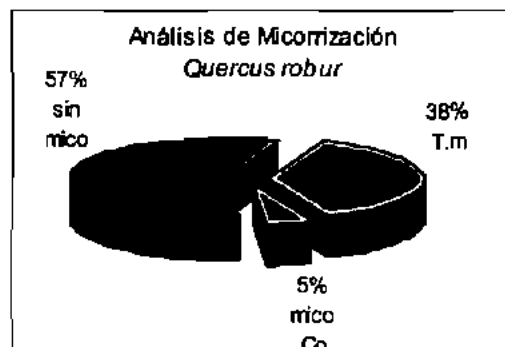
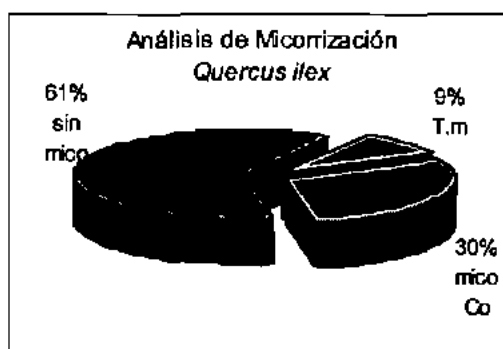
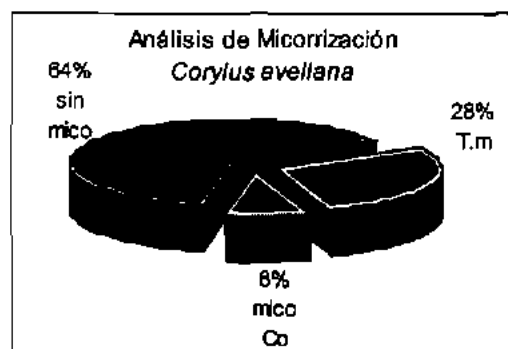
La evaluación consiste principalmente en un análisis cualitativo y cuantitativo de las raicillas obtenidas de las muestras, identificando micorrizas de *T. melanosporum* u otras micorrizas.

El análisis fue realizado en el laboratorio de micorrizas de la Universidad Católica del Maule, y los resultados se presentan a continuación.

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICORRÍCICO

Primer análisis.- Noviembre, 2004

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 28%                | 9%             | 38%             |
| Con otras micorrizas        | 8%                 | 30%            | 5%              |
| Sin micorrizas              | 64%                | 61%            | 57%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

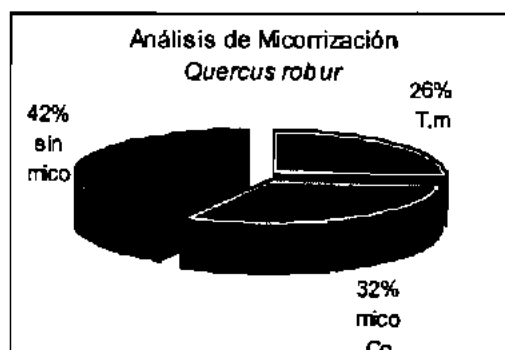
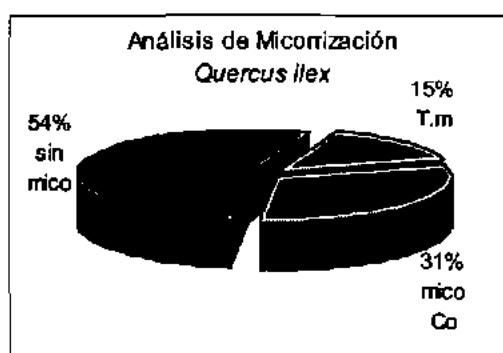
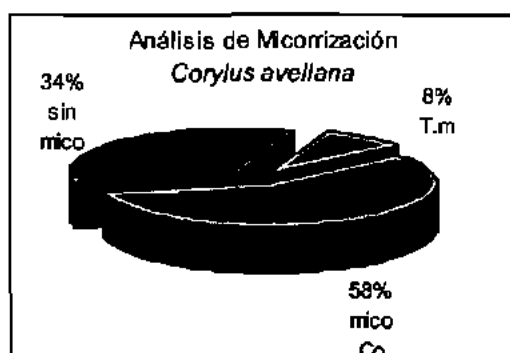
sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

**Segundo análisis.-** Noviembre, 2005

| PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN |                    |                |                 |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| Micorrizas                  | ESPECIE            |                |                 |
|                             | <i>C. avellana</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. robur</i> |
| Con <i>T. melanosporum</i>  | 8%                 | 15%            | 26%             |
| Con otras micorrizas        | 58%                | 31%            | 32%             |
| Sin micorrizas              | 34%                | 54%            | 42%             |
| TOTAL                       | 100%               | 100%           | 100%            |



Las series corresponden a:

sin mico.- Ápices sin micorrizas.

mico Co.- Ápices micorrizados con otras micorrizas.

mico T.m.- Ápices micorrizados con *Tuber melanosporum*

## **OBSERVACIONES**

La evaluación micorrícica manifiesta un buen desarrollo de *Tuber melanosporum* en la simbiosis con la especie *Quercus robur*, los análisis muestran micorrizas bien definida, que se presentan formando aglomerados. Esto reflejado en los porcentajes de micorrización que arrojan resultados promisorios y son un buen indicador del establecimiento del hongo en terreno.

La presencia de micorrizas no deseadas es relevante a fin de establecer futuras prácticas de cultivo, orientadas principalmente a las especies establecidas, considerando la competitividad de la especie invasora. La agresividad de esta especie a desplazado significativamente el espacio de *Tuber melanosporum*, factor crítico para un óptimo desarrollo de este hongo.

## **CONTACTOS:**

Universidad Católica del Maule  
Departamento de Ciencias Forestales  
e-mail: **proyecto@ucm.cl**  
Tel: 56-71-203500  
Fax: 56-71-203524





**Proyecto TRUFICULTURA**

**"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"**

---

Financiamiento:  
Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile

Participantes:  
Universidad Católica del Maule, Chile.  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España.

Fecha Inicio: Noviembre 2001  
Fecha Término: Octubre 2005



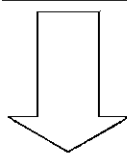
**MARCO DEL PROYECTO**

- Opción de incorporar un cultivo con buena rentabilidad en pequeñas superficies
- Posibilidad para implantar el cultivo en suelos de baja productividad agrícola (límite entre forestal y agrícola).
- La drástica disminución de las producciones naturales en Europa y oferta de trufa en período contra temporada  
⇒ Gran potencial de mercado para una posible producción en Chile

**MARCO DEL PROYECTO**

- Costo de envío bajo en relación a los precios del producto
- *Quercus robur*, *Q. ilex* y *Corylus avellana* presentan buena adaptación a condiciones agroclimáticas locales.
- Experiencias en otras regiones fuera de su distribución natural en Europa: Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Israel y Sudáfrica.
- Posibilidad de revalorización de especies nativas (*Nothofagus* spp.)

**OBJETIVO GENERAL**



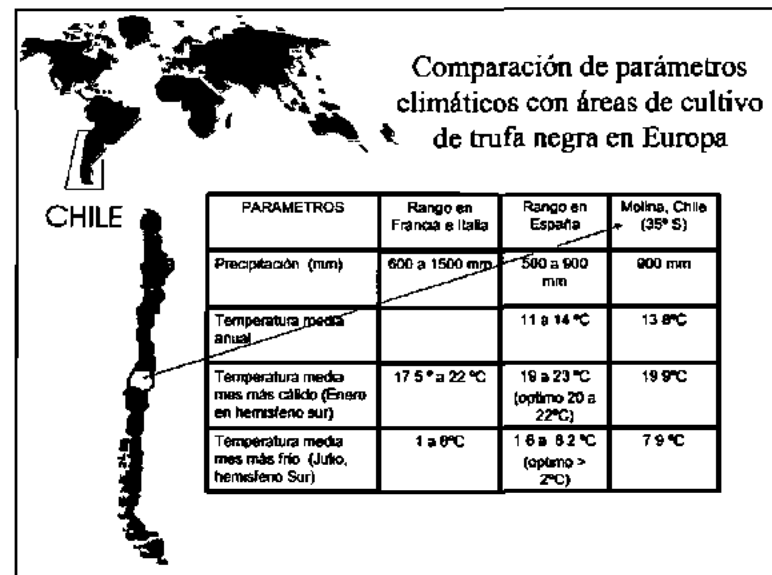
Desarrollar e implementar tecnologías adecuadas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario

### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

1. Micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt., en condiciones semi-controladas para las especies:
  - *Quercus ilex* (encina)
  - *Quercus robur* (encino común)
  - *Corylus avellana* (avellano europeo)
2. Ensayos de inoculación con *Tuber melanosporum* en especies nativas del género *Nothofagus*.
3. Control cualitativo y cuantitativo de la micorrización de plantas con *Tuber melanosporum*, Vitt.

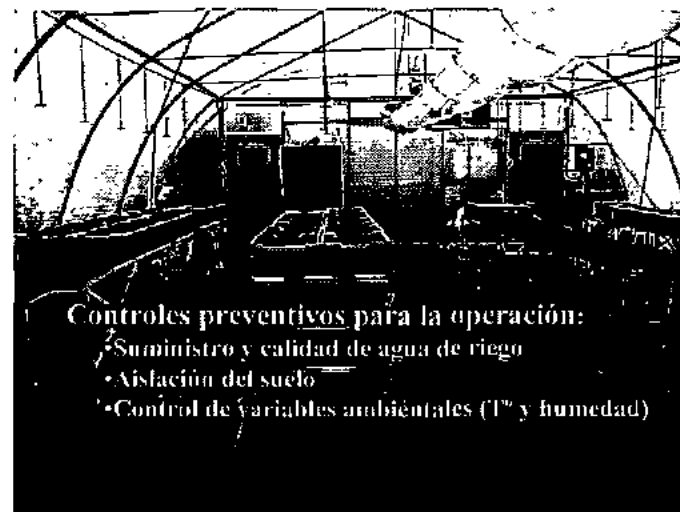
### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

4. Evaluación del potencial de desarrollo de *Tuber melanosporum*, Vitt. como un cultivo en Chile.
5. Seguimiento y evaluación de la micorrización en unidades experimentales de campo.
6. Transferencia de tecnologías a productores, instituciones, profesionales y técnicos del sector



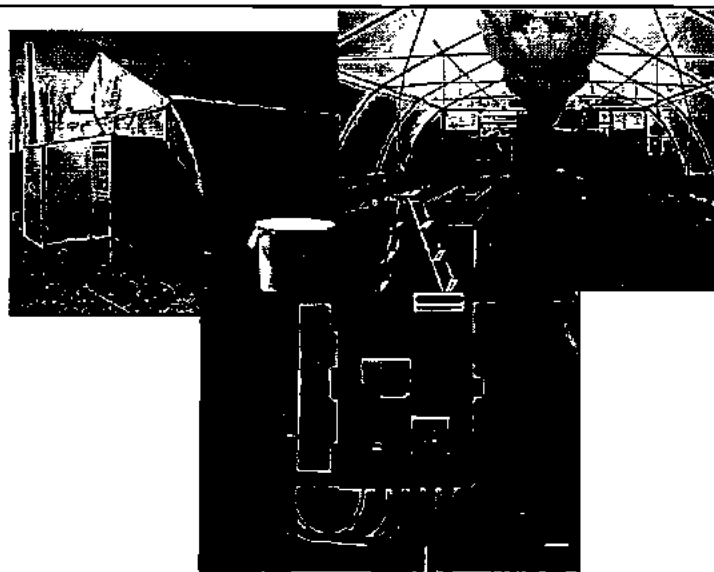
## AVANCES DEL PROYECTO

1. Implementación de invernadero y sistema productivo
2. Obtención del material genético base:
  - Inóculo de Trufa puro (*Tuber melanosporum*, Vitt.)
  - Semillas (*Q. ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana* y *Nothofagus sp.*)
3. Cultivo y controles del material vegetal previo a inoculación
4. Proceso de inoculación
5. Selección de predios para establecer las unidades experimentales de campo
6. Establecimiento de unidades experimentales



### Controles preventivos para la operación:

- Suministro y calidad de agua de riego
- Aislación del suelo
- Control de variables ambientales (T° y humedad)



## Obtención del inóculo

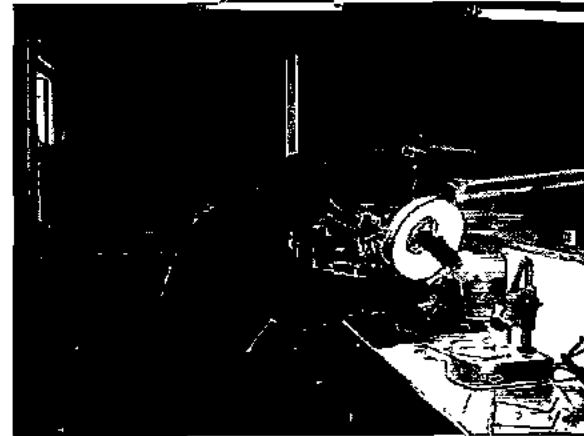
### ACCIONES CLAVES:

- Confiabilidad del suministro de trufa (España)
- Recolección del material en campo (Período adecuado)
- Control de calidad y pureza del material
- Preparación e internación del inóculo

### Recolección de trufas para internar a Chile (El Toro, Castellón, España)



### Control de pureza del inóculo



### Análisis de esporas y ascas (Identificación de especie mediante características morfoanatómicas)

### Cultivo de plantas previo a inoculación

#### ASPECTOS CLAVES:

- Condiciones de asepsia
- Control del ambiente y
- Sistema de cultivo
- Control del material vegetal de cara a la inoculación con trufa

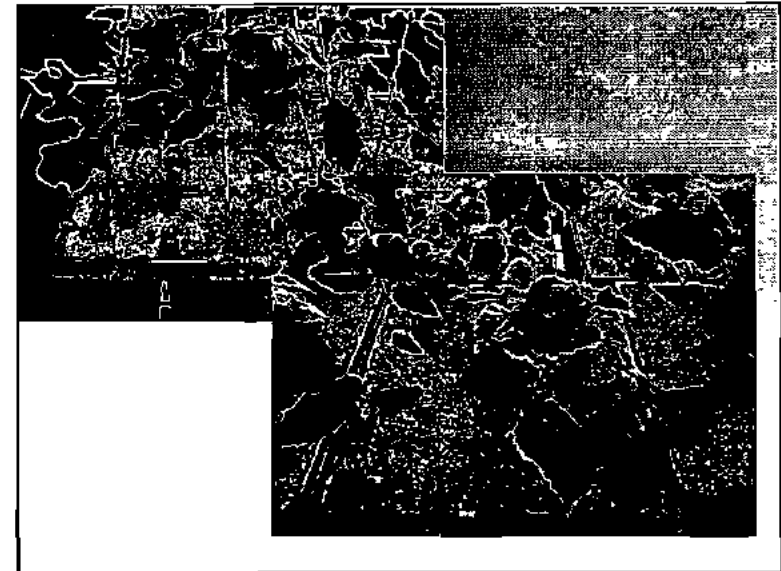




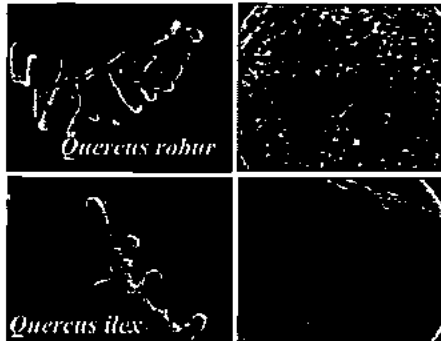
## Proceso de inoculación

### ASPECTOS CLAVES:

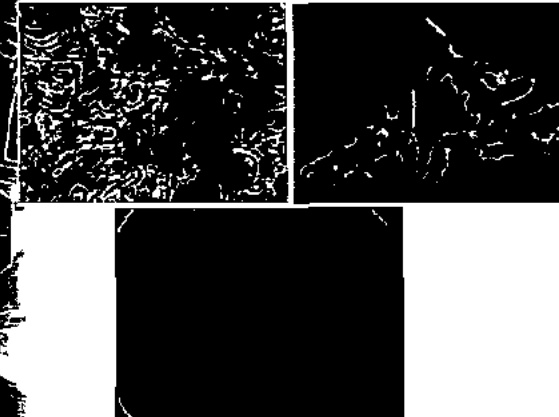
- Condiciones de asepsia (Substrato, contenedores, utensilios y agua de riego)
- Control del ambiente (Temperatura y humedad)
- Método de inoculación y trasplante



## Análisis de micorrizas



## Análisis de micorrizas



Rango de características de micorriza de *T. melanosporum*



#### Evaluación de micorrización (6 meses posterior a inoculación)

| Huésped                   | % Promedio de raicillas micorrizadas con Trufa |
|---------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Quercus ilex</i>       | 48 %                                           |
| <i>Corylus avellana</i>   | 50%                                            |
| <i>Nothofagus obliqua</i> | 15%                                            |
|                           |                                                |



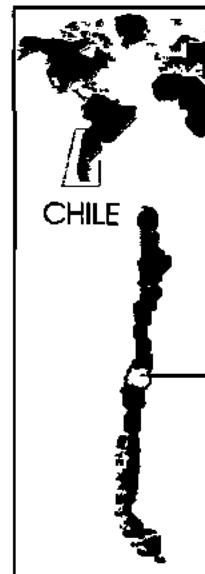
#### Selección y establecimiento de sitios plantaciones experimentales

- Se evaluaron las condiciones de suelo y clima de diferentes áreas de la zona centro sur de Chile
- Se ajustaron a las condiciones ecológicas requeridas por la trufa (*T. melanosporum*)



#### Plantaciones experimentales (piloto)

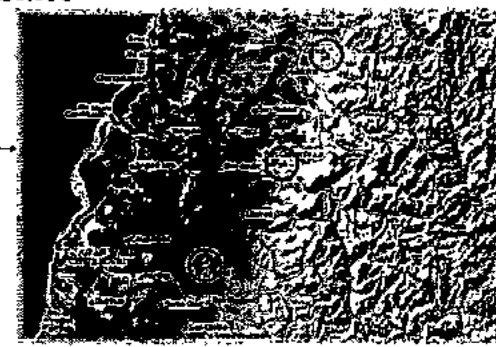
- Sitios seleccionados:
  - “Santa Elisa” Parral(36 ° 8' S)
  - “Maitenes” San Clemente (35° 35' S)
  - “Los Niches, Curicó” (35° 05' S)



#### Plantaciones experimentales

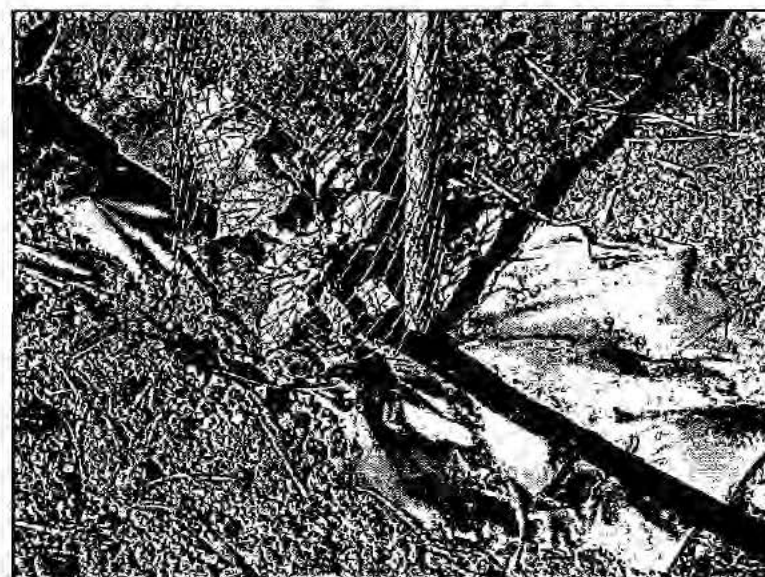
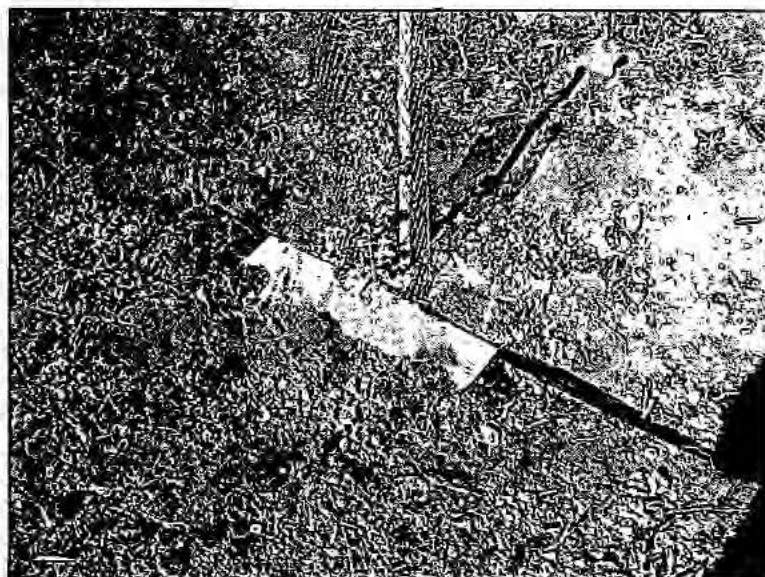
CHILE

- Sitios



### Preparación de sitios y establecimiento

- Consistió principalmente en labores mecánicas poco profundas y aplicación de enmienda con cal para aumentar el pH de los suelos
- Se aplicó aproximadamente una proporción de 15 ton. por hectárea de cal fina para ajustar el pH.
- Recientemente, se han establecido las primeras plantaciones experimentales, bajo diferentes condiciones ambientales y de cultivo.



MUCHAS GRACIAS POR  
SU ATENCIÓN

## ANEXO 8.3



**Proyecto TRUFICULTURA**

**"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"**

---

**Financiamiento:**  
Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile

**Participantes:**  
Universidad Católica del Maule, Chile.  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España

**Fecha Inicio:** Noviembre 2001  
**Fecha Término:** Octubre 2005



### MARCO DEL PROYECTO

#### Situación Chilena:

- Menor presencia y diversidad de hongos de ectomicorriza en comparación al hemisferio norte, especialmente en suelos de uso agrícola y ganadero
- La drástica disminución de las producciones naturales en Europa y oferta de trufa en período contra temporada
  - ⇒ Gran potencial de mercado para una posible producción en Chile

### MARCO DEL PROYECTO

#### Situación Chilena:

- Posibilidad para implantar el cultivo en suelos agrícolas de zona centro-sur de Chile:
  - Factores de clima
  - Factores de suelo
- Experiencias previas en otras regiones mediterráneas fuera de su área natural: Tasmania, Australia, Nueva Zelanda, Israel, Sudáfrica, USA, Argentina.

### OBJETIVO GENERAL



Desarrollar e implementar tecnologías adecuadas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario

### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

1. Micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt., en condiciones semi-controladas para las especies:
  - *Quercus ilex* (encina)
  - *Quercus robur* (encino común)
  - *Corylus avellana* (avellano europeo)
2. Ensayos de inoculación con *Tuber melanosporum* en especies nativas del género *Nothofagus*.
3. Control cualitativo y cuantitativo de la micorrización de plantas con *Tuber melanosporum*, Vitt.

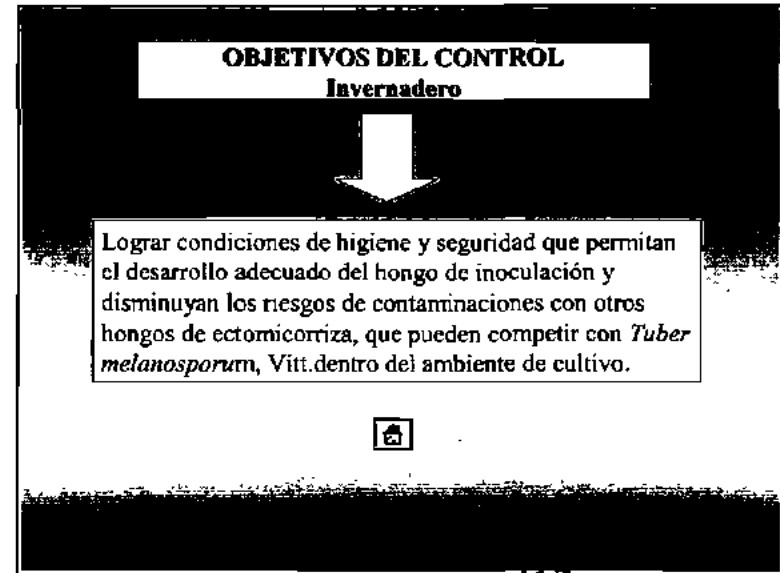
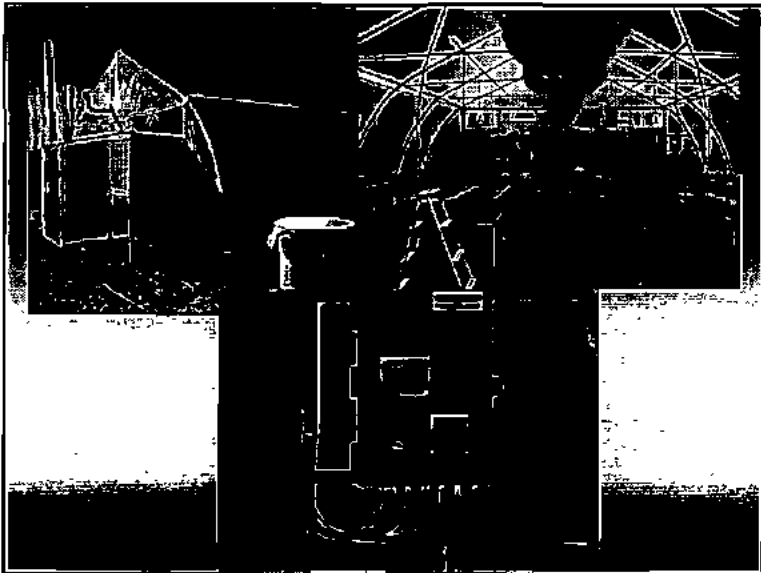
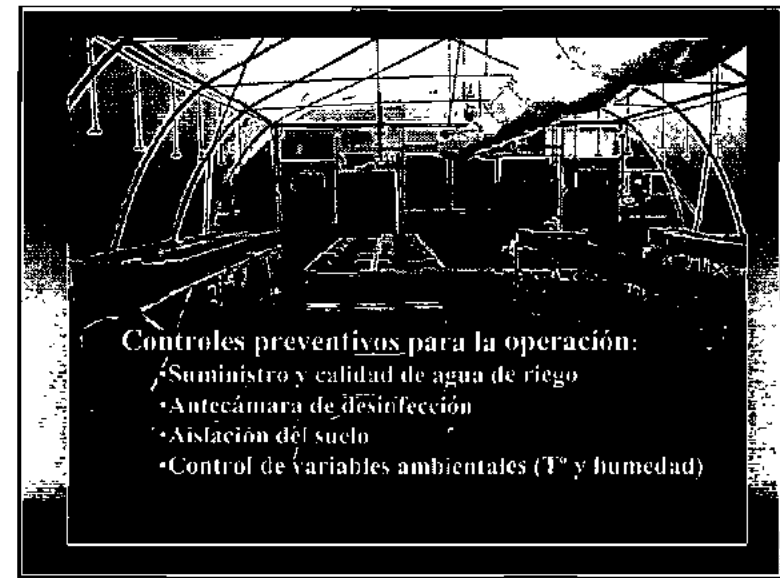
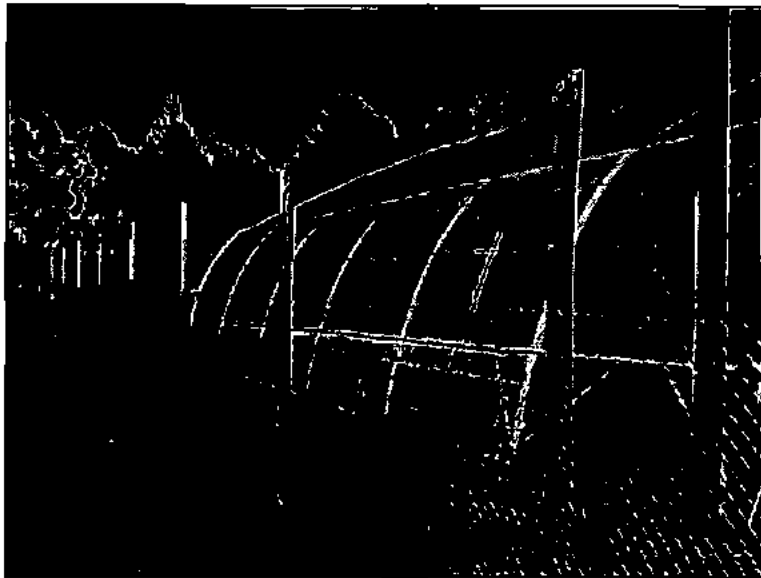
### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

4. Evaluación del potencial de desarrollo de *Tuber melanosporum*, Vitt. como un cultivo en Chile, en relación a los requerimientos ecológicos del hongo, especies simbiotes y perspectivas comerciales.
5. Seguimiento y evaluación de la micorrización en unidades experimentales establecidas en campo, bajo diferentes condiciones ambientales y de cultivo.
6. Transferencia de tecnologías a productores, instituciones, profesionales y técnicos del sector

### AVANCES DEL PROYECTO

1. Implementación de invernadero y sistema productivo 
2. Obtención del material genético base:
  - Inóculo de Trufa puro (*Tuber melanosporum*, Vitt.)
  - Semillas (*Q. ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana* y *Nothofagus* sp.)
3. Cultivo y controles del material vegetal previo a inoculación 
4. Avances en proceso de inoculación 
5. Prospección y evaluación de predios para establecer las unidades experimentales de campo 

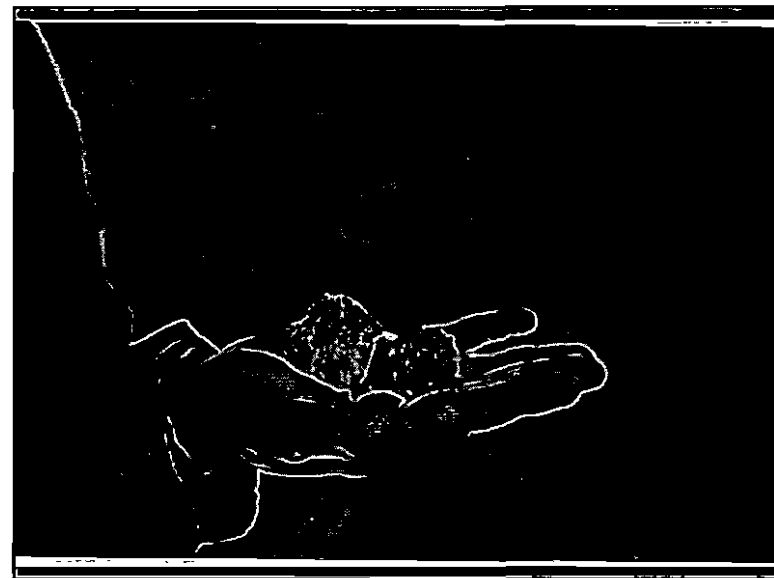




## Obtención del inóculo

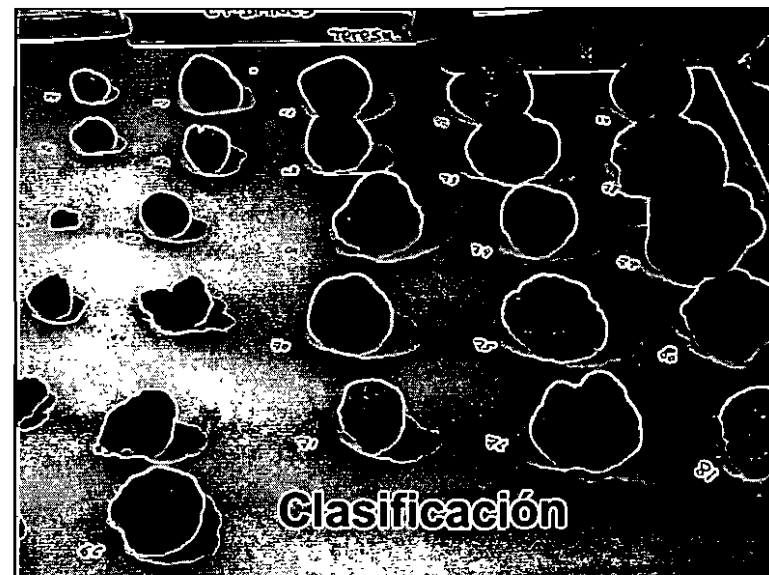
### ACCIONES CLAVES:

- Confiabilidad del suministro de trufa (España)
- Recolección del material en campo (Período adecuado)
- Control de calidad y pureza del material
- Preparación e internación del inóculo

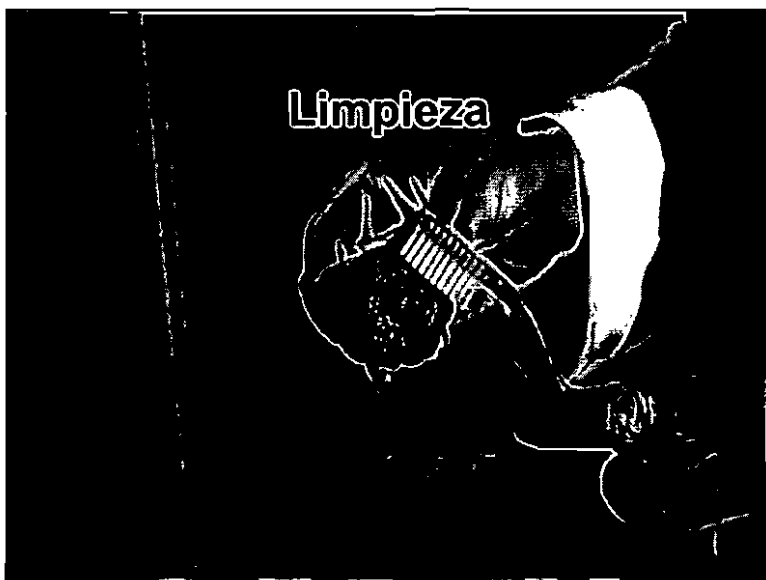




### Control de calidad del material fúngico

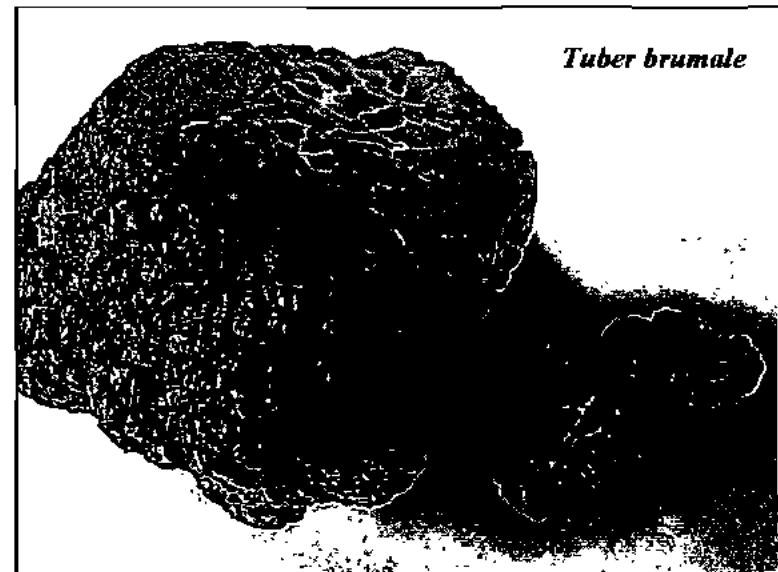


### Limpieza

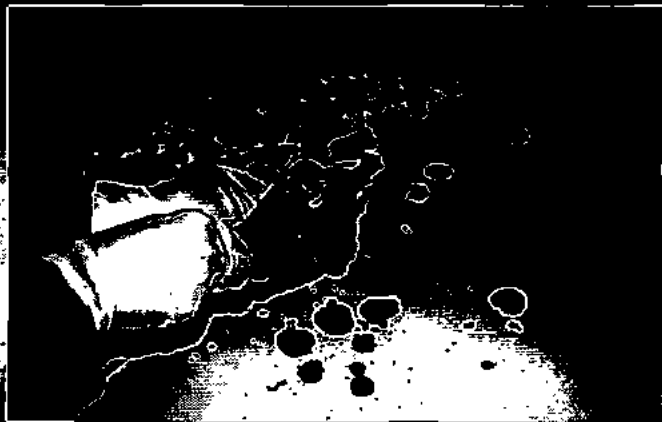


### Desinfección





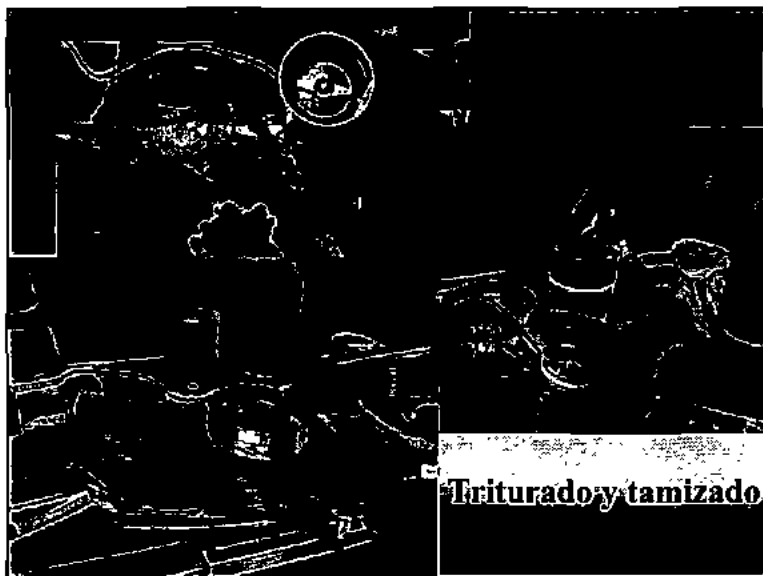
**Preparación e internación del Inóculo**



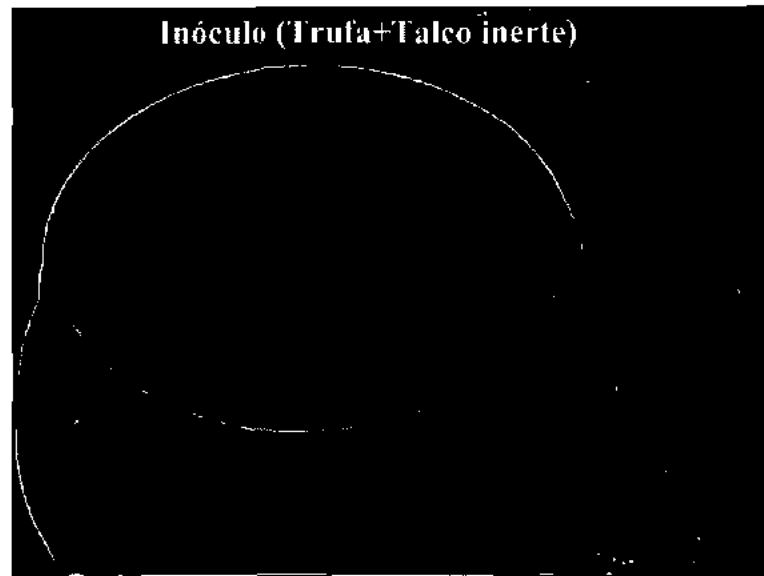
**Laminado y secado del material**



**Triturado y tamizado**



**Inóculo (Trufa+Talco inerte)**

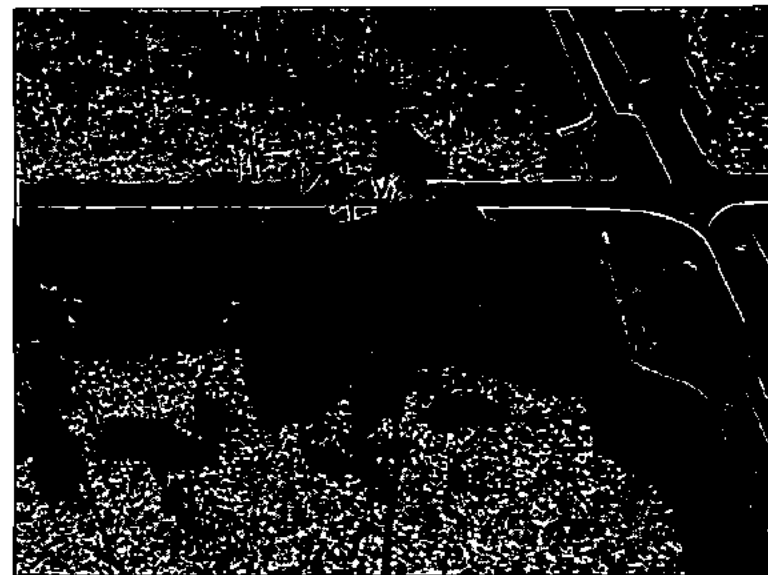
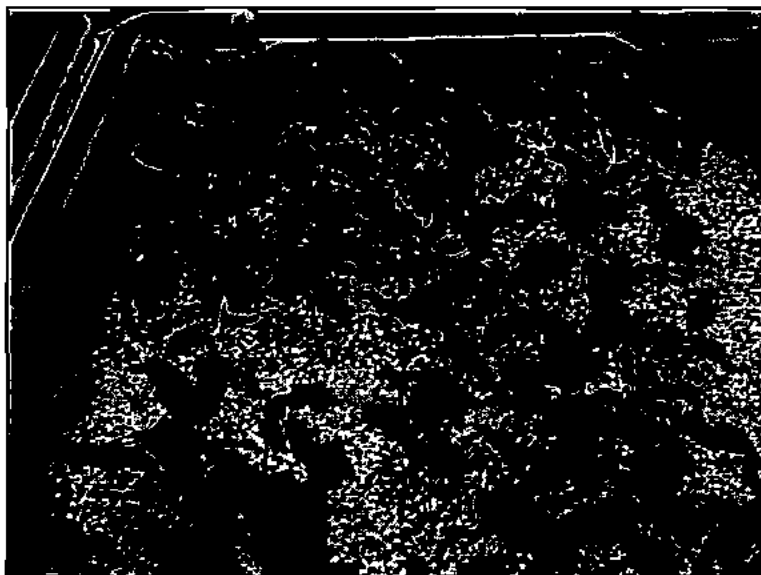


## Cultivo de plantas previo a inoculación



### ASPECTOS CLAVES:

- Condiciones de esterilidad
- Control del ambiente y
- Sistema de cultivo
- Control del material vegetal de cara a la micorrización

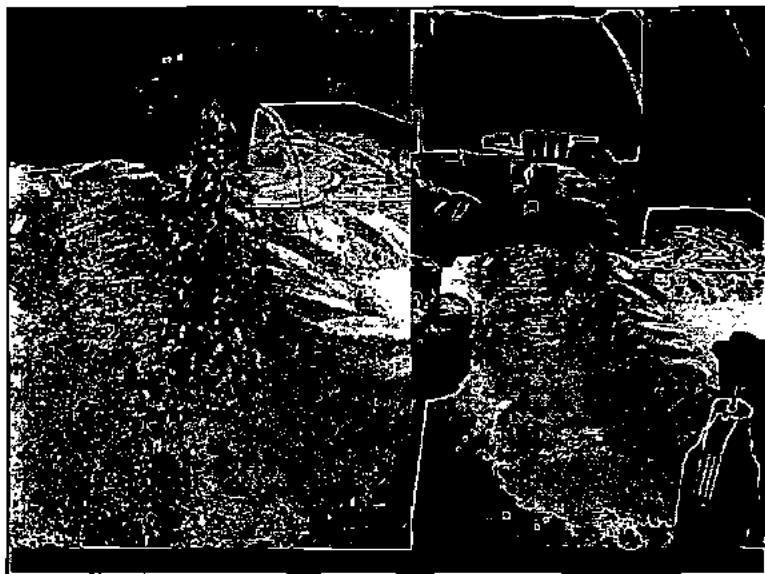


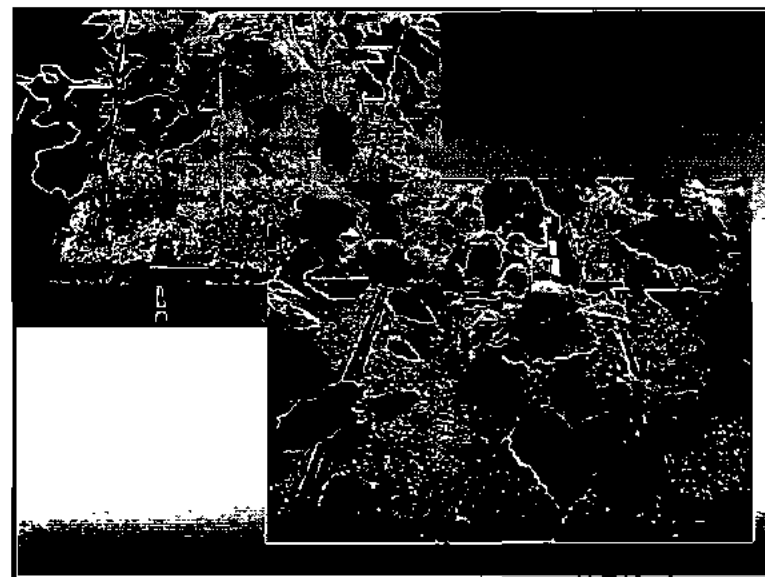
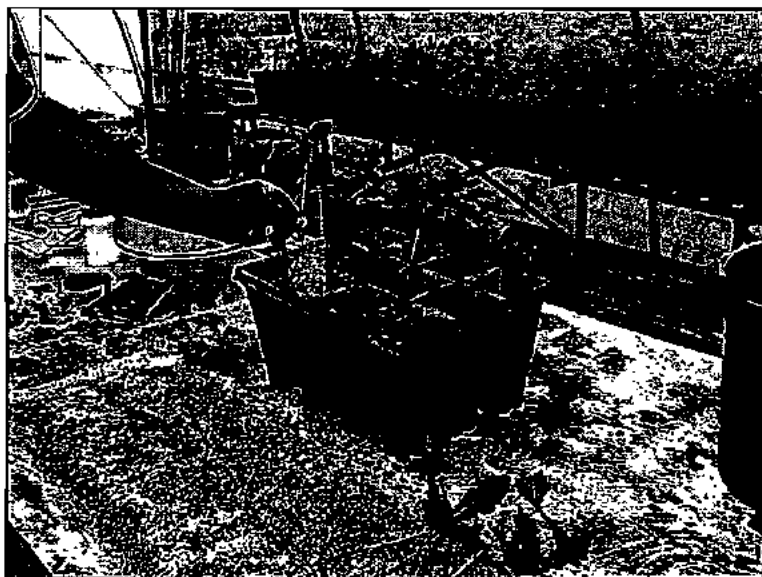


## Proceso de inoculación

### ASPECTOS CLAVES:

- Condiciones de esterilidad (Substrato, contenedores, utensilios y agua de riego)
- Control del ambiente (Temperatura y humedad)
- Sistema de inoculación y transplante





### **Prospección y evaluación de sitios Unidades experimentales**

- **Contactos con agricultores**
- **Prospección y evaluación de sitios**
  - Características de suelo
  - Características de clima
  - Fisiografía
  - Cultivos precedentes
- **Establecimiento de convenios de cooperación**

## ANEXO 8.4

### Truficultura: OPORTUNIDADES Y PERSPECTIVAS PARA CHILE

#### Consideraciones técnicas y económicas

- Chile presenta una flora única con solo unas pocas especies formando ectomicorizas, principalmente especies del género *Nothofagus* y algunas otras especies nativas. La expansión de plantaciones industriales como el pino radiata y eucaliptus, podría aumentar la incidencia de hongos ectomicorrícicos, los cuales pueden competir con nuevas especies introducidas, pero aún hay muchas áreas donde la microflora de ectomicorizas es escasa, principalmente en suelos utilizados por la agricultura tradicional.
- Existe una buena oportunidad para desarrollar el cultivo y producción de trufa negra en Chile, basado en la tecnología disponible, su factibilidad de adopción en el país y el desarrollo de esquemas de control que aseguren la calidad de la producción.

Existe una excelente oportunidad para establecer y desarrollar el cultivo de trufa negra como una alternativa productiva y de negocio para el sector silvoagropecuario en Chile. Los puntos claves son los siguientes:

#### CONSIDERACIONES TECNICAS

- Chile presenta una gran diversidad edafoclimática, lo cual podría asegurar en gran medida, que las condiciones de suelo y clima adecuados para la trufa, pueden ser encontradas en la zona centro-sur del país, especialmente donde la precipitación natural puede ser complementada mediante irrigación.

- El establecimiento y desarrollo de la truficultura en Chile debiera ser capaz de evitar la contaminación y sustitución de *Tuber melanosporum* por especies sin interés comercial, mediante acciones preventivas y controles estrictos del proceso productivo.

#### CONSIDERACIONES ECONOMICAS

- Producir trufa negra en Chile, otorga una excelente oportunidad de negocio para el sector silvoagropecuario, especialmente en zonas marginales para la agricultura tradicional, donde ésta ya no presenta una adecuada rentabilidad.
- Existe en Chile la oportunidad de producir *Tuber melanosporum* fresco, para el mercado contratemporada de Europa, donde el producto podría estar disponible desde Marzo a Septiembre. Una producción en Chile no afectaría el tradicional y bien establecido mercado de la trufa fresca en el hemisferio Norte, el cual normalmente funciona desde Noviembre a Marzo.

- Existe un buen potencial de mercado para una oferta de trufa fresca desde Chile, como un sustituto muy superior a las trufas en conserva usadas en Europa, Japón y USA, las cuales logran precios más altos.
- Para proteger sus intereses, los mercados europeos de trufa en conserva podrían poner resistencia al ingreso de trufa fresca desde Chile. Incluso si tales barreras fueran exitosas, los mercados asiáticos podrían consumir toda una posible producción desde Chile.
- Chile podría competir directamente con Nueva Zelanda y Australia, donde ya existen cultivos en producción. Sin embargo su oferta es pequeña como para ser una amenaza, además la demanda actual y proyectada en los mercados del hemisferio norte va en constante aumento debido a la drástica caída que ha tenido la producción natural en Europa.

- El tiempo requerido para establecer la producción comercial de trufa en Chile y las distintas rentabilidades que se podrían lograr, indican la necesidad de establecer un sistema productivo en tres etapas separadas con tres separados y posiblemente interdependientes grupos de beneficiarios: inoculación, cultivo en campo y comercialización
- Para proteger la integridad de una industria y asegurar la producción de trufa con calidad certificada, será crítico disponer de un proceso de inoculación capaz de garantizar la calidad de los árboles que se distribuyan a los agnecultores junto con la información necesaria y una adecuada asistencia técnica. De otra forma una planta micorrizada de inadecuada calidad podría ser antieconómico para los productores.



## ANEXO 8.5





**Proyecto TRUFICULTURA**

"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"

---

**Financiamiento**  
Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.

**Participantes.**  
Universidad Católica del Maule, Chile  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España.

**Fecha Inicio:** Noviembre 2001  
**Fecha Término:** Octubre 2005

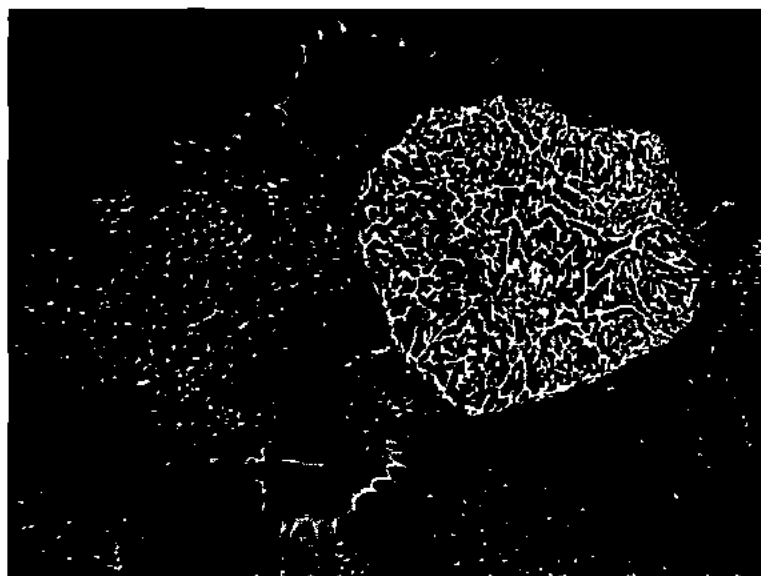






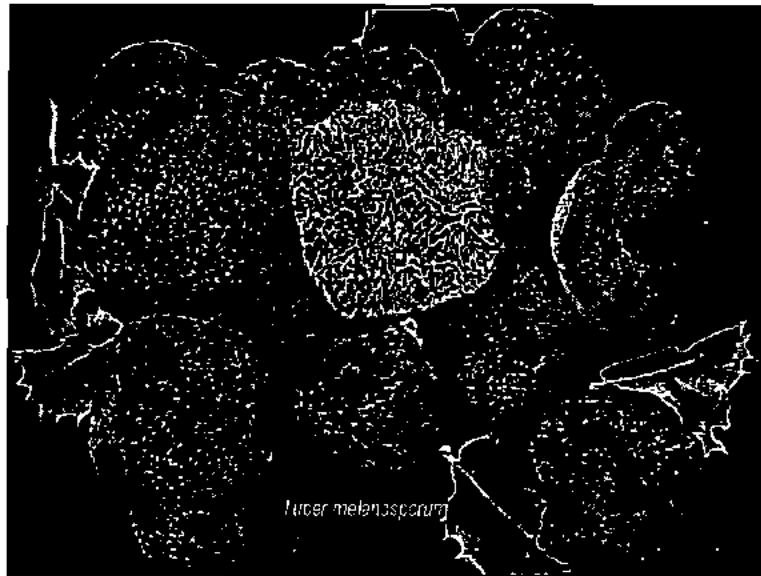
**Estado Actual de la Truficultura en Europa, mercado y perspectivas futuras.**

**SANTIAGO REYNA DOMENECH**  
Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo. CEAM. Parque Tecnológico. Valencia.  
Escuela T.S. Ingenieros Agrónomos y de Montes. Universidad Politécnica de Valencia



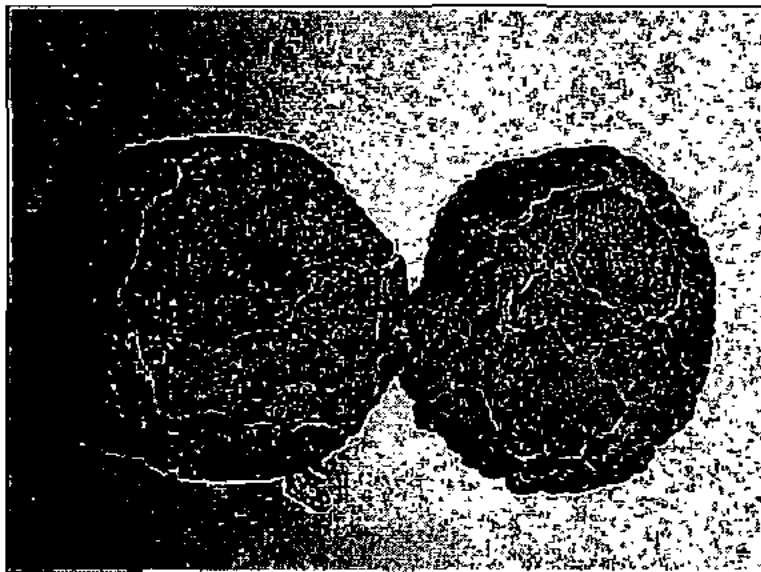
**¿Que es la trufa?**

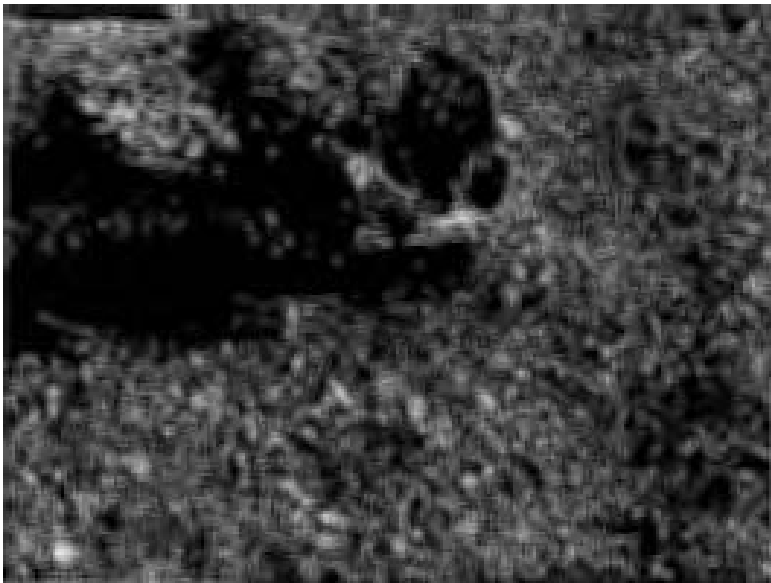
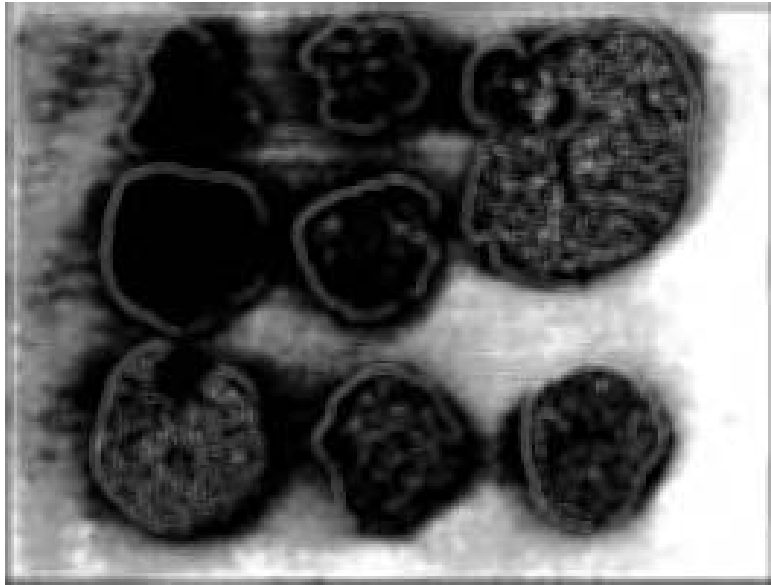
- § Hongos comestibles que crecen bajo tierra extraordinariamente aromáticos.
- § La trufa mas conocida y una de las mas valiasas es la trufa negra o trufa del Perigord
- § Cada vez mas generalizado la utilización del nombre científico de *Tuber melanosporum*



## ¿Que es la trufa?

- § Formas redondeadas y tamaños comprendidos entre el de un guisante y un melón pequeño.
- § Forman una asociación de tipo simbiótico, denominada micorriza, con ciertos árboles.
- § Su aprecio en la cocina de calidad se debe a su intenso aroma lleno de matices que se fija profundamente en los alimentos



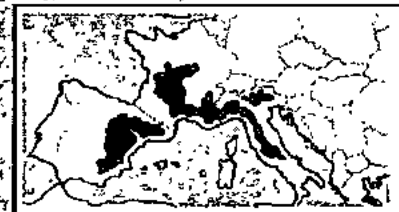




## ¿Que es la trufa?

- S Afrodisiaco, Erótico
- S Mágico, diabólico
- S Testículos del diablo
- S Esotérico, iniciático
- S Lobanillo de la tierra
- S Producto del trueno
- S Generación espontánea

La trufa esta presente en zonas de clima estrictamente Mediterráneo y en menor grado de régimen Atlántico con sequía estival poco acentuada.



Los principales productores son Francia, Italia y España, con el 90% de la producción mundial.

Se ha introducido en USA, Sudáfrica, Australia, Tasmania, Nueva Zelanda, Argentina e Israel.

## TIPOS DE TRUFA

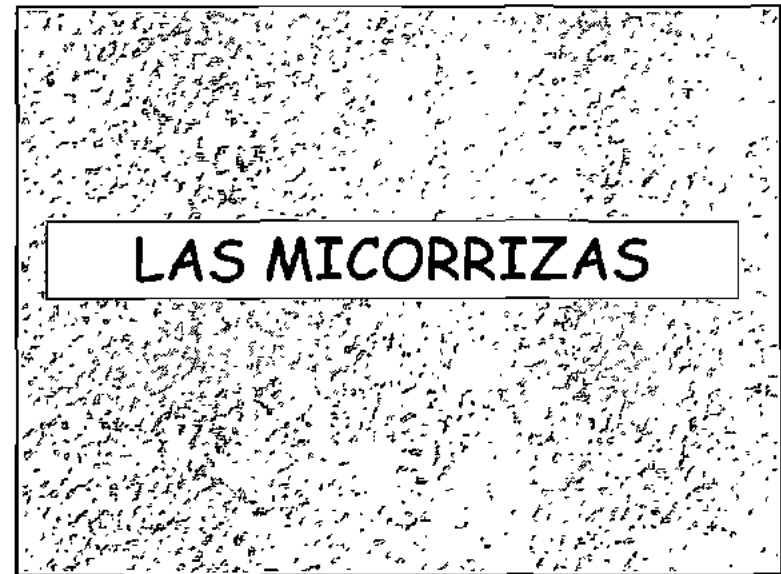
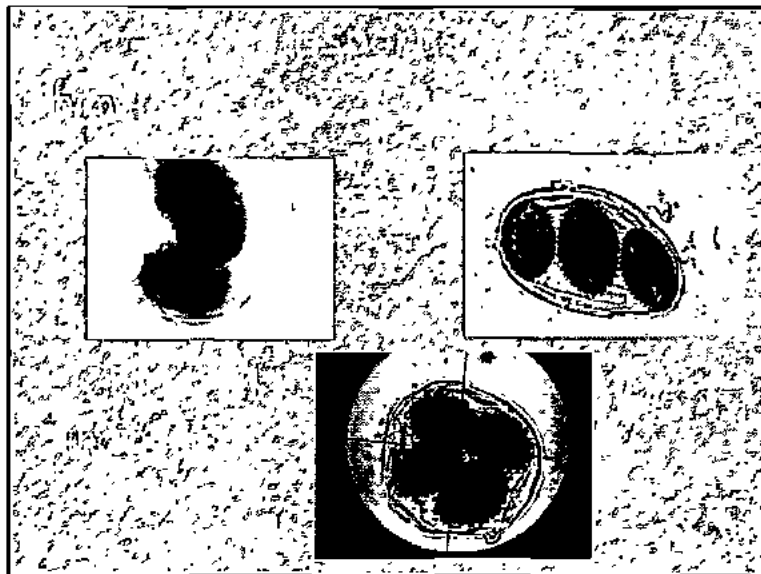
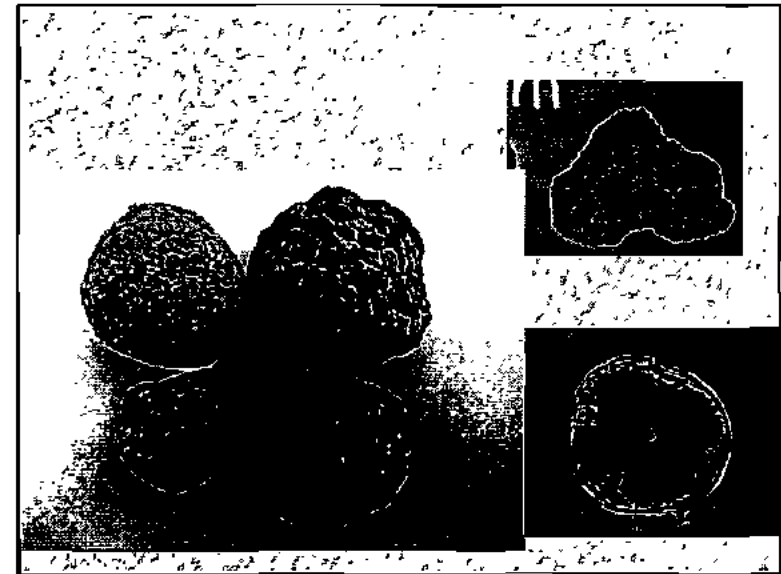
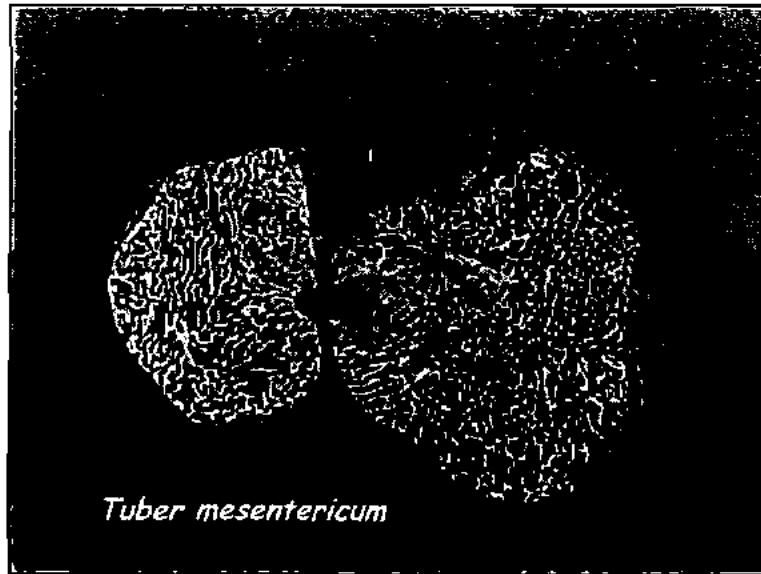
Principales especies de trufas

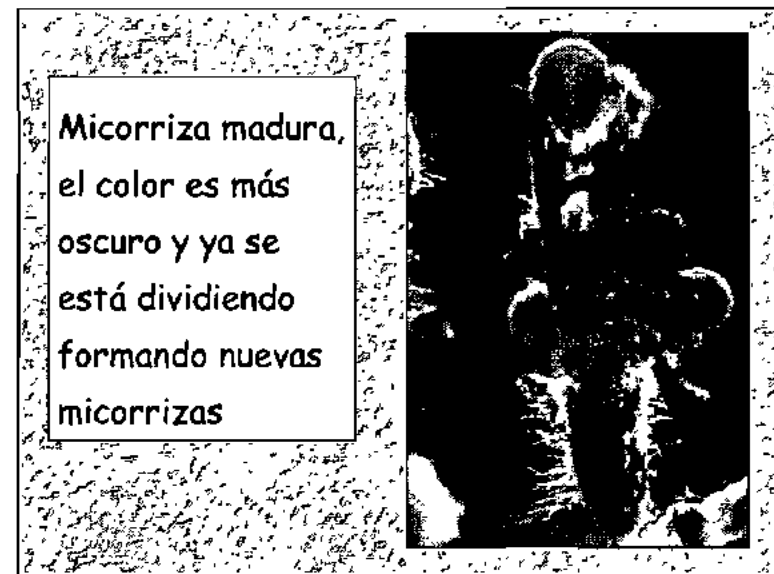
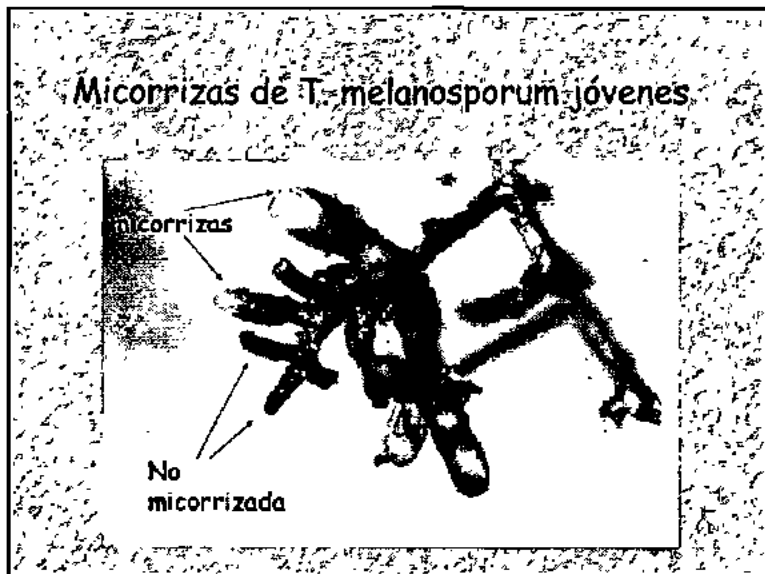
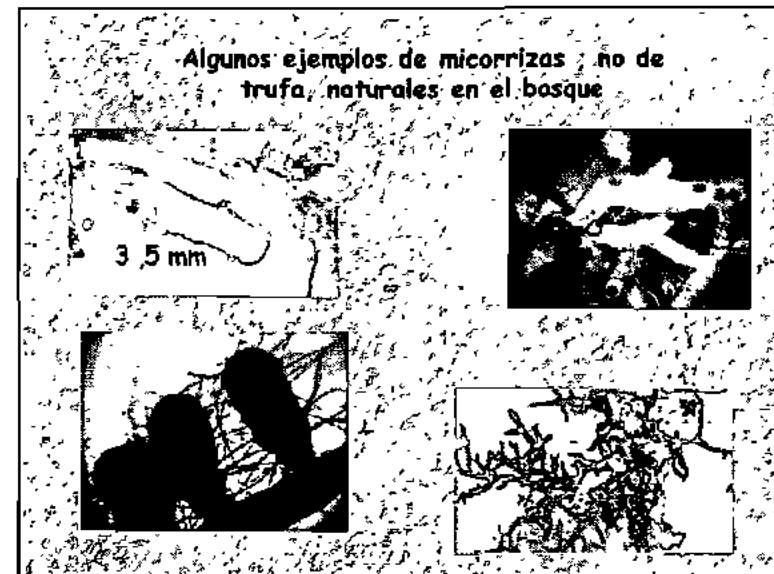
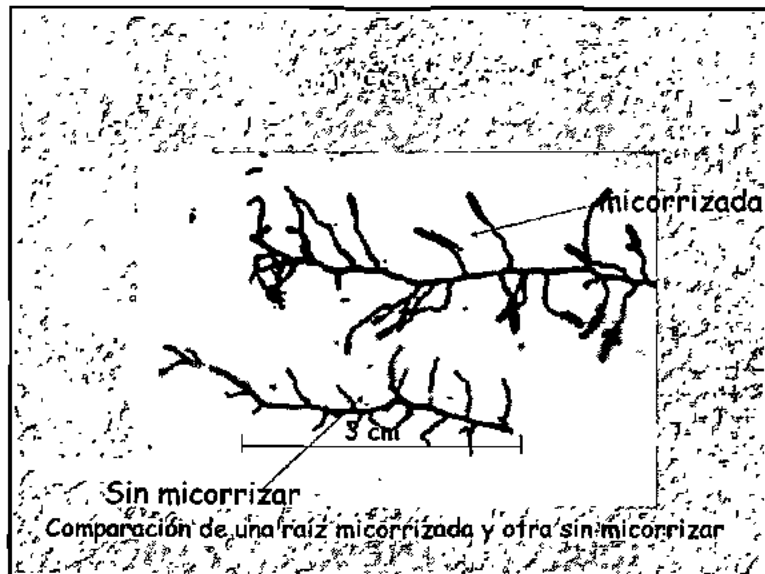
Brumale

Melanosporum

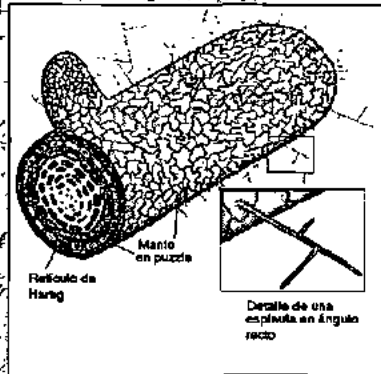
Aestivum

*Tuber magnatum*



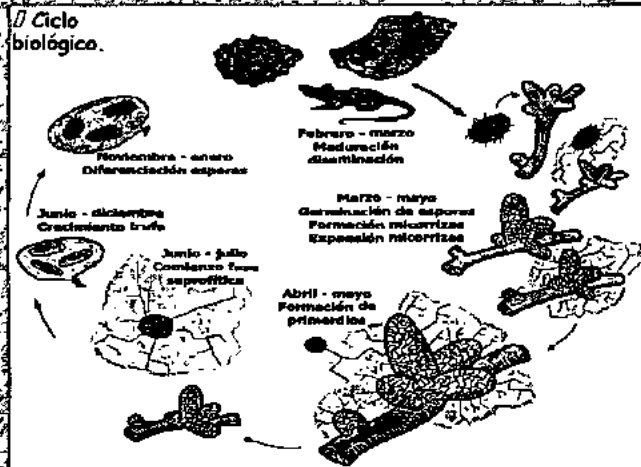


Las micorrizas de trufa son ectotróficas!  
el micelio del hongo no entra dentro de las  
células de la raíz

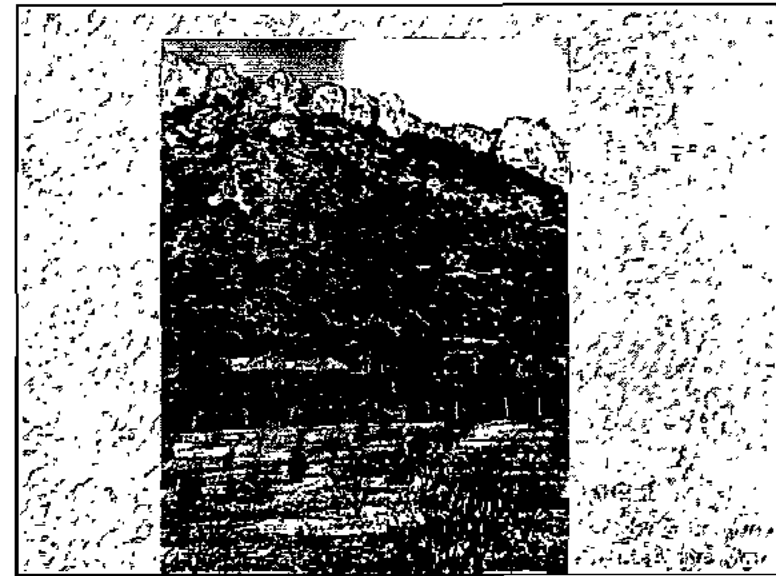


## CICLO BIOLÓGICO

### LA TRUFA NEGRA (*Tuber melanosporum* Vitt.)



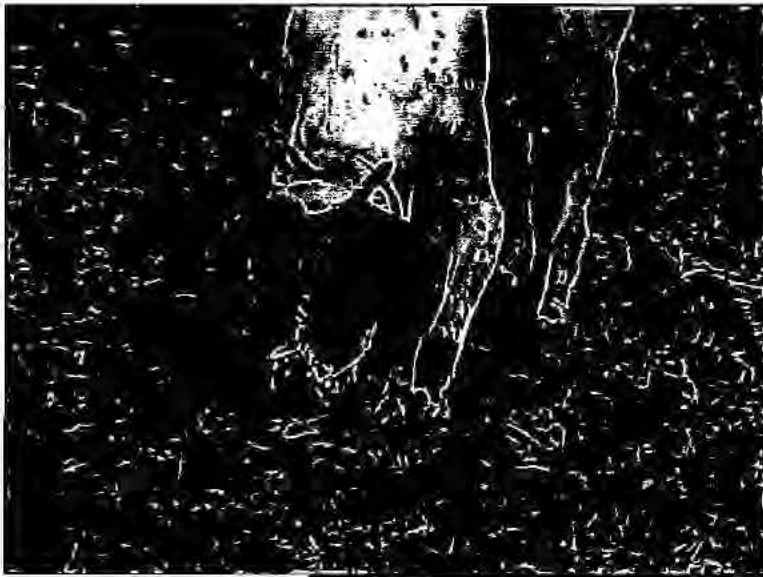
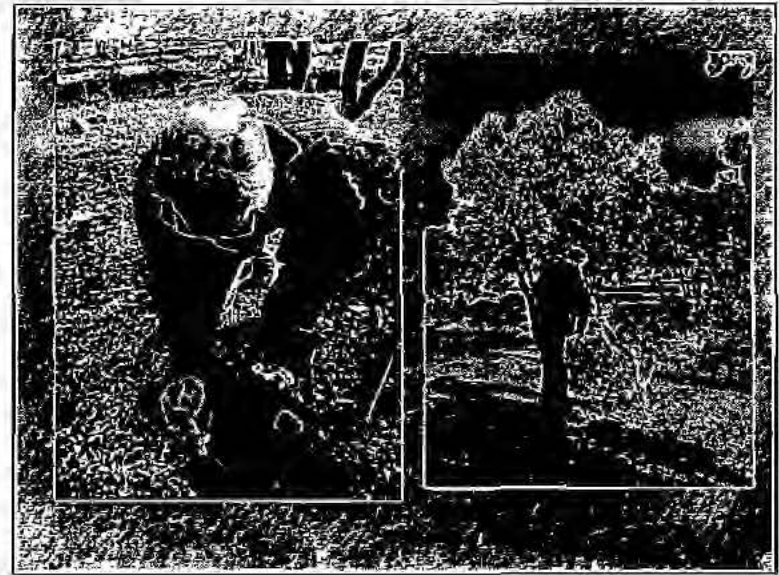
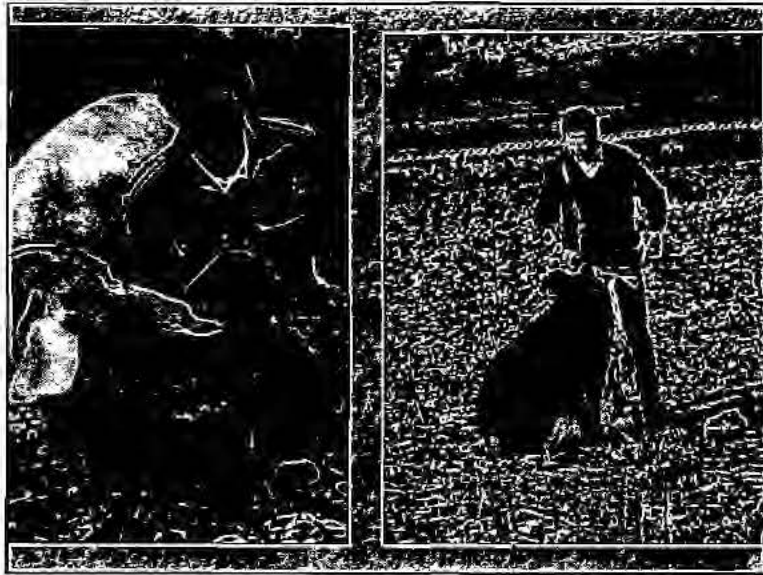




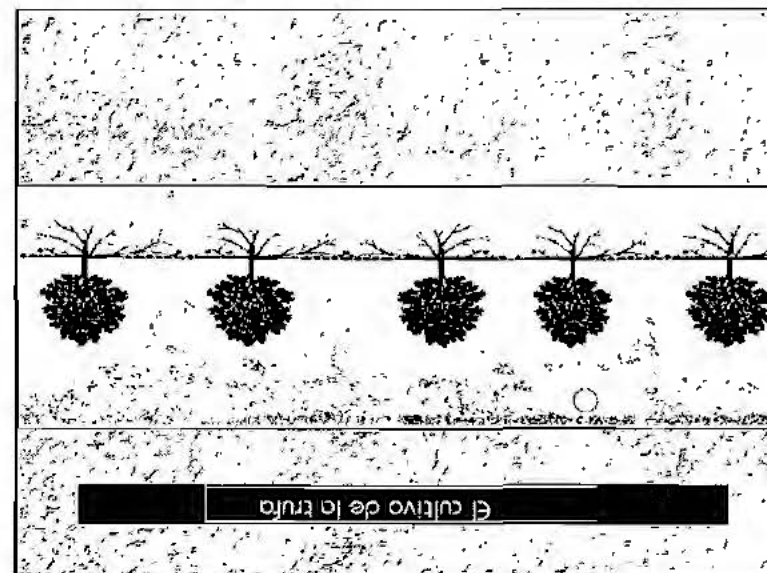
## CAZAR TRUFAS

### Cazar trufas

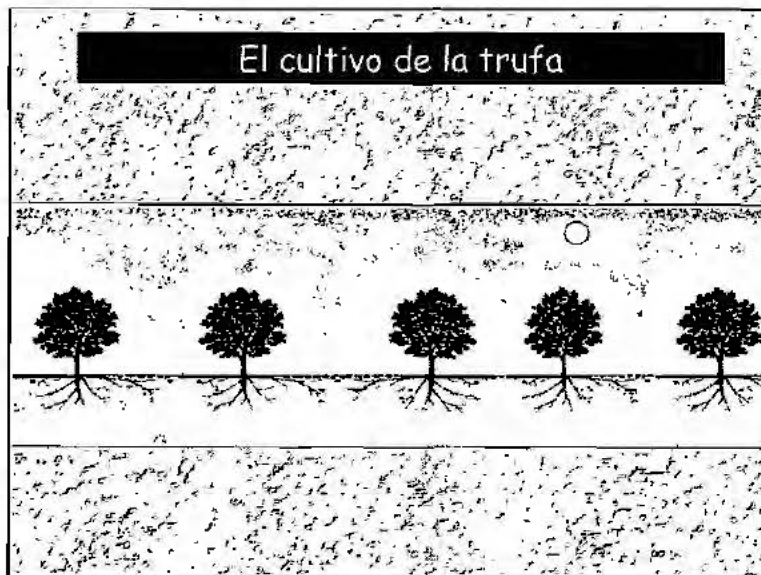
- § La búsqueda de trufa suele denominarse por los truferos "cazar trufas" por similitud con la actividad cinegética. (época, lugar, perro, en la incertidumbre de los resultados y en el aspecto lúdico..)
- § En origen, en Francia especialmente, la trufa se buscaba con cerdo, mejor si era hembra, solía llevar un anillo en la jeta



## TRUFICULTURA



## El cultivo de la trufa



## La Truficultura

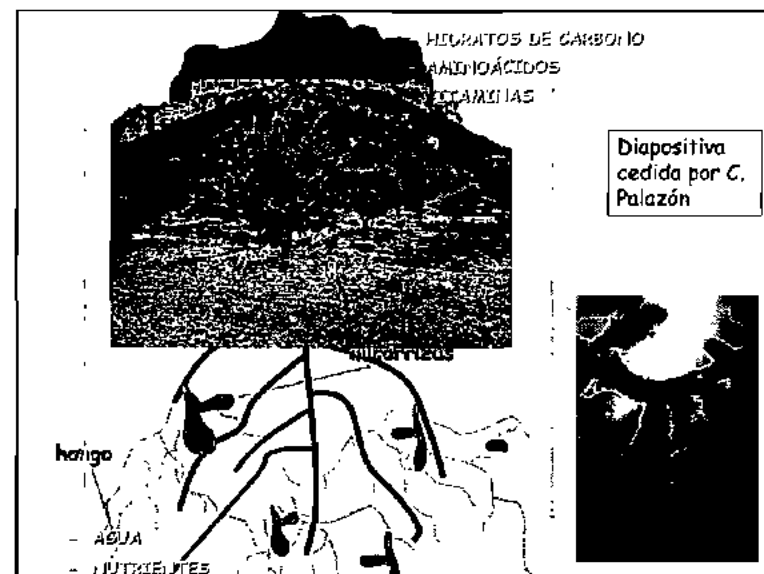
- § Una de las cuestiones en las que se debe insistir es que la trufa se cultiva indirectamente mediante un árbol interpuesto.
- § Cultivaremos árboles (encinas generalmente) para que en sus raíces crezca un hongo de micorriza, la trufa.
- § Es un cultivo sobre un cultivo y esto dará lugar a situaciones un tanto raras en comparación con lo agriculturo de tipa tradicional.

## Cultivo de un hongo sobre las raíces de una planta.

§ ¿Lo mejor para la planta es lo mejor para el hongo?

§ Hay plantas con mayor predisposición que otras?

§ Que esta pasando en las raíces ?



## TRUFICULTURA VENTAJAS

- Labores poco intensas, poco mantenimiento
- Alternativa en áreas marginales
- Amplia demanda. Oferta escasa. Precios extraordinarios
- Escasas necesidades de agua
- Sin pesticidas Producto ecológico y natural, Contribuye a la forestación
- Económicamente rentable TIR de 8 a 20% Subvencionable

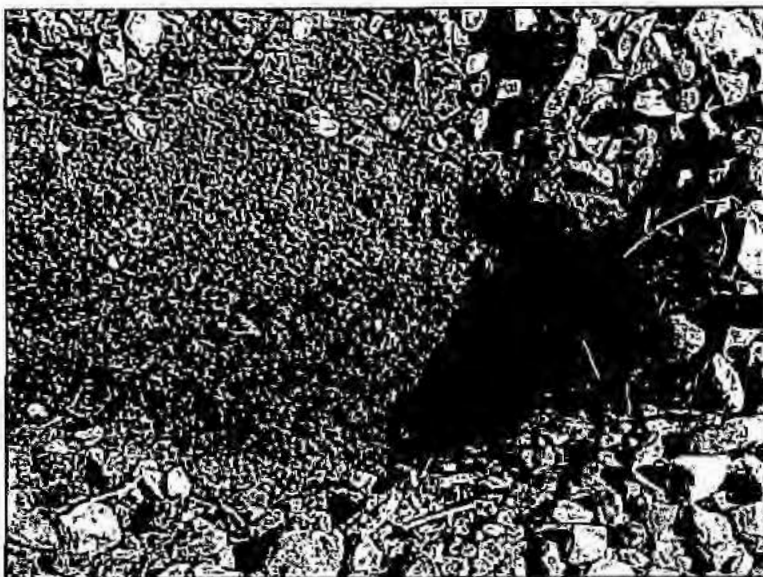
## TRUFICULTURA inconvenientes

- Cultivo de un hongo sobre las raíces de una planta.
- Subterráneo: no se ve la evolución.
- Periodo largo sin producción.
- Secretismo.
- Producción insegura.

## CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

1°

### ELECCIÓN DE PARCELA ADECUADA



## Suelo apto para truficultura

Suelo rico en calcio  
sin encharcamientos ni napas freáticas  
pendiente ligera (2-15%)  
pH alcalino, próximo a 8  
Textura franca  
Estructura grumosa que favorece la permeabilidad y la aireación  
Suelos pedregosos preferiblemente  
Materia Orgánica relativamente abundante 2-4 % con relación C/N cercana a 10  
En Chile es necesario enmendar con caliza los suelos

## Precipitaciones (España)

Necesidades pluviométricas entre los 500-900 l/m<sup>2</sup> anuales

Las primaveras no deben ser secas

Los inviernos con poca lluvia

Sequía estival no muy intensa, en verano lluvias por encima de los 100 mm si no se alcanza recurrir al riego

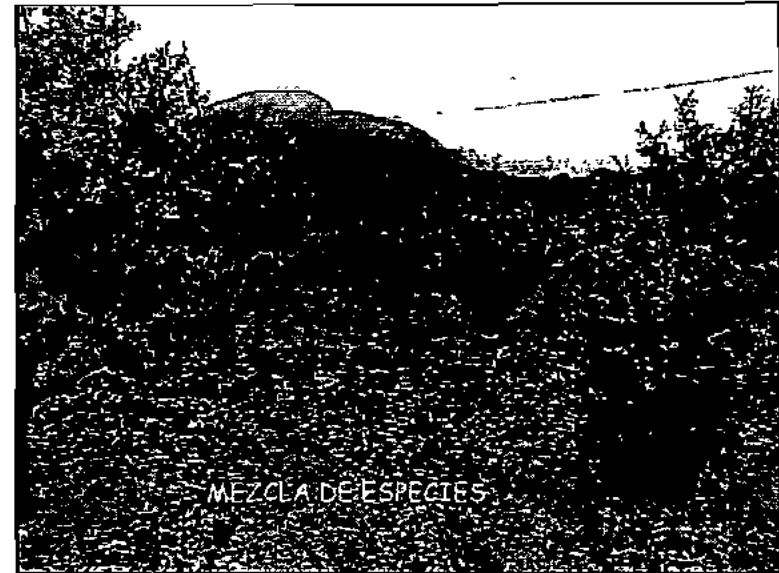
En la región de clima mediterráneo de Chile sería necesario dar riegos de apoyo

## CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

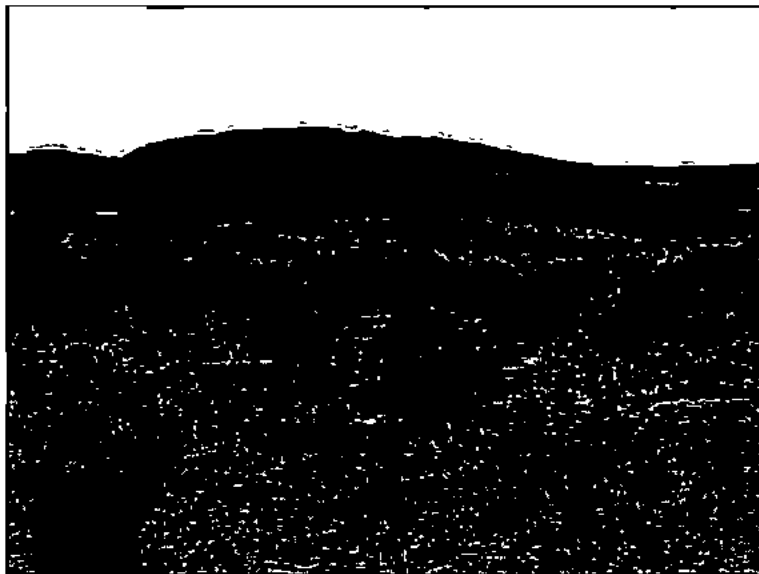
2º

### ELECCIÓN DE LA ESPECIE ADECUADA

Nothofagus? encina roble avellano



MEZCLA DE ESPECIES



## CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

3º

### PREPARACIÓN DEL TERRENO



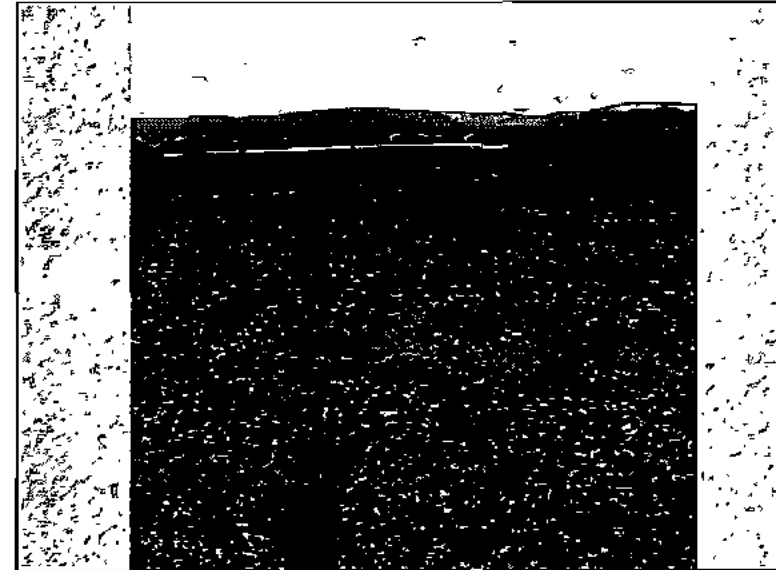
## PREPARACIÓN DEL TERRENO

Depende de la naturaleza del mismo

Otoño: labor media-profunda con vertedera (30-50cm)

Subsolado contra la formación de suelo de labor

Invierno: pase de cultivador, para nivelar, refinar y eliminar malas hierbas



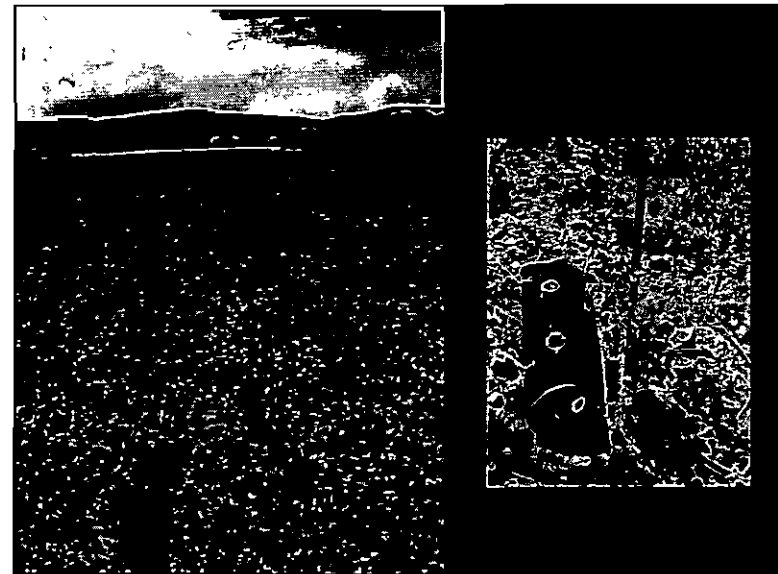
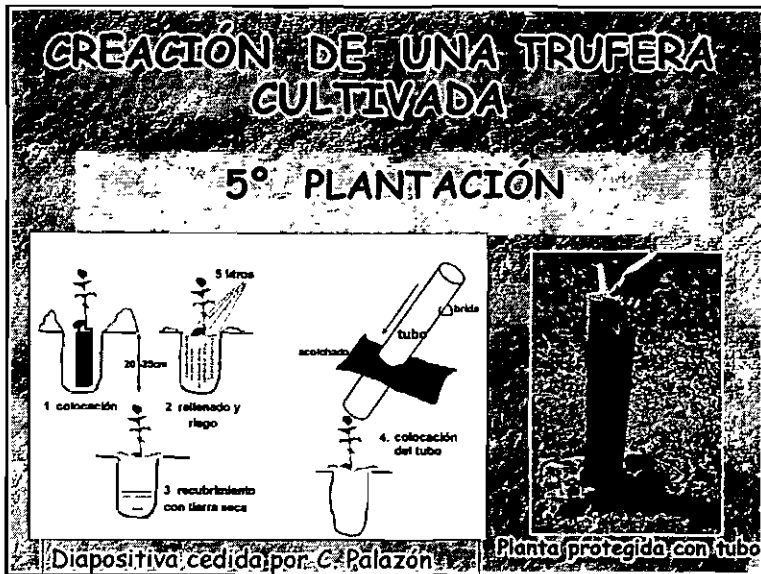
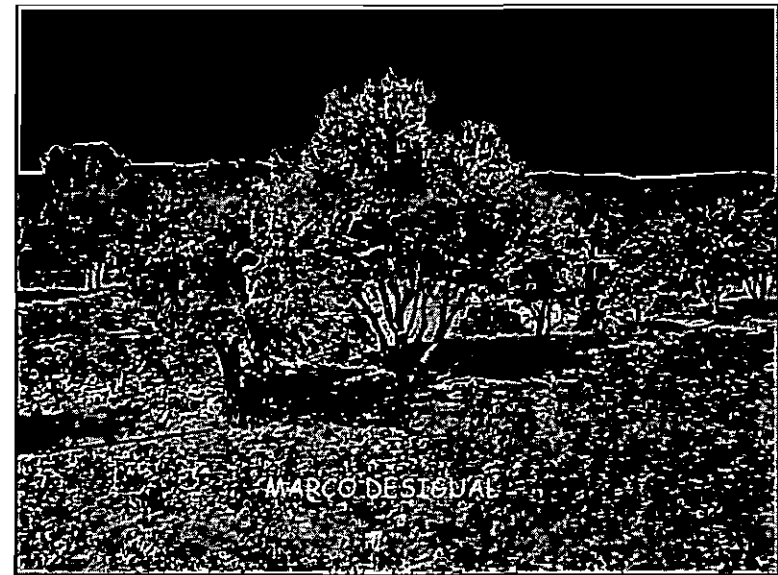
## CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

4°

ELECCIÓN DEL  
MARCO DE PLANTACIÓN

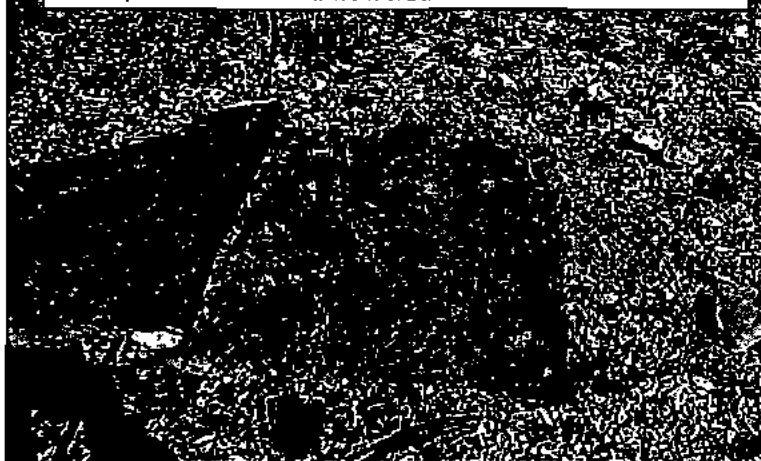
## MARCO DE PLANTACIÓN

- ✓ Dependiente del riego y del terreno
- ✓ 6 x 6, 7 x 7, 8 x 8 los más usuales
- ✓ 3 x 6, 3 x 7 plantaciones en hileras, con instalaciones de microaspersión





La colocación en el alcorque de la planta de material de **acolchado** inerte como, paja, cascara de almendra, geotextiles etc también ayudará a conservar agua y es una práctica bastante habitual que, además, evita la salida de malas hierbas



Estos tubos fomentan el crecimiento en altura, evitan la pérdida de agua por transpiración y defienden la planta de los posibles daños del ganado o la fauna silvestre.

## CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

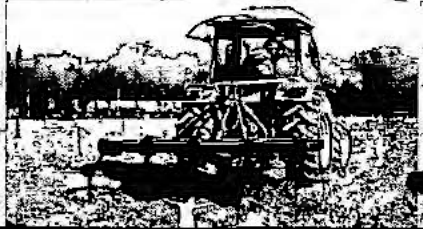
6º

### LABOREO DEL SUELO

### LABOREO DEL SUELO

- ✂ Desde inicio al 4º - 5º año :
  - Airear, labores superficiales (10cm), eliminar hierbas, no hay restricción de fechas.
- ✂ Desde aparición de quemados:
  - labores manuales muy superficiales en quemados 1-2
  - labores superficiales entre calles (10cm) en abril-mayo
- ✂ Desde entrada en producción:
  - labores mínimas de mantenimiento siempre superficiales (5 - 8 cm). Repaso manual de los quemados. Motozados (sin arrastre ni volteo)

Diapositiva cedida por C. Palazón




**NORMA BASICA:**  
 Labores superficiales, aireando el terreno, eliminando malas hierbas competidoras, pero respetando el sistema radical de la planta trufera

# CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

7º

## EL RIEGO

DEPENDIENTE DE:

- Pluviometría
- Naturaleza y drenaje del suelo
- Tipo de parcela y edad plantas

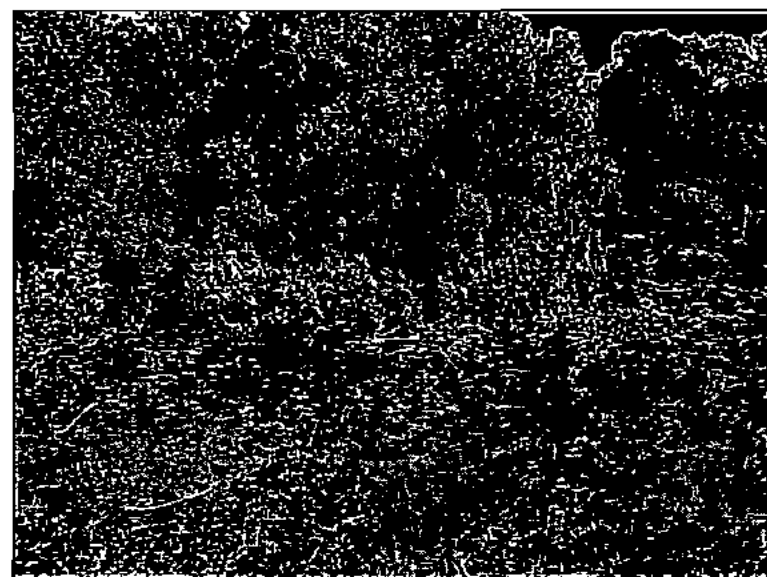
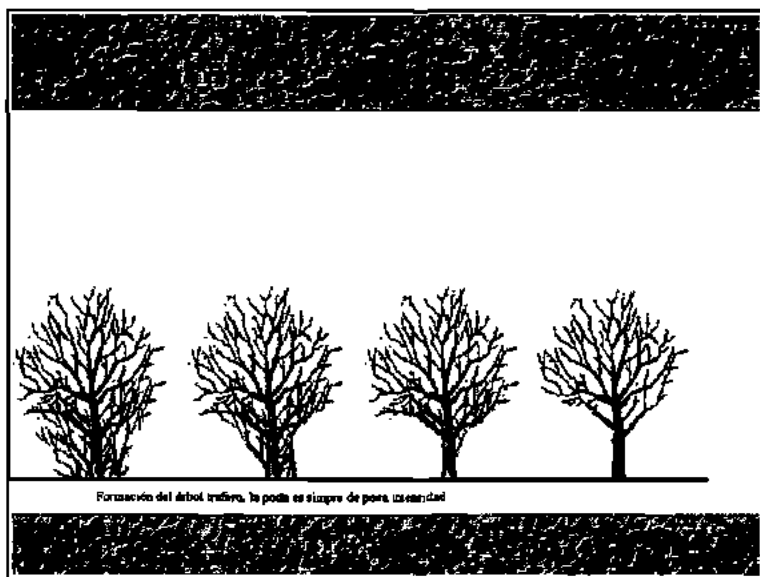
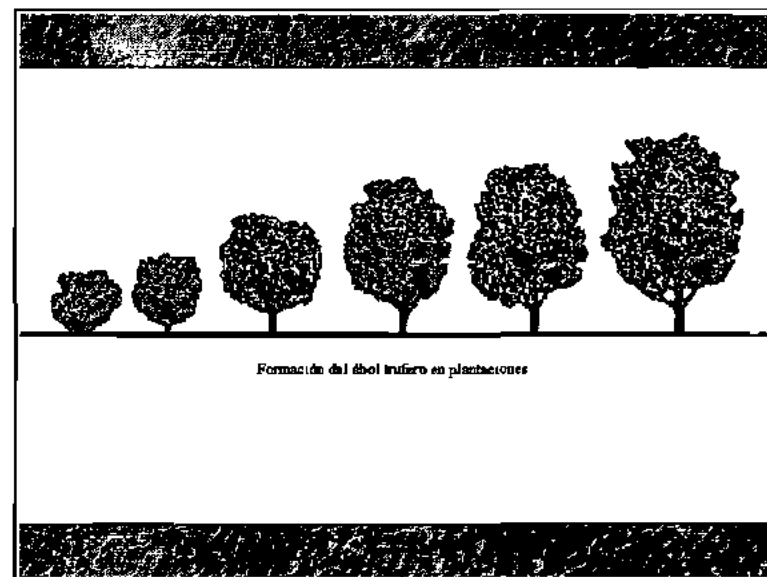
**TIPOS DE RIEGO:**

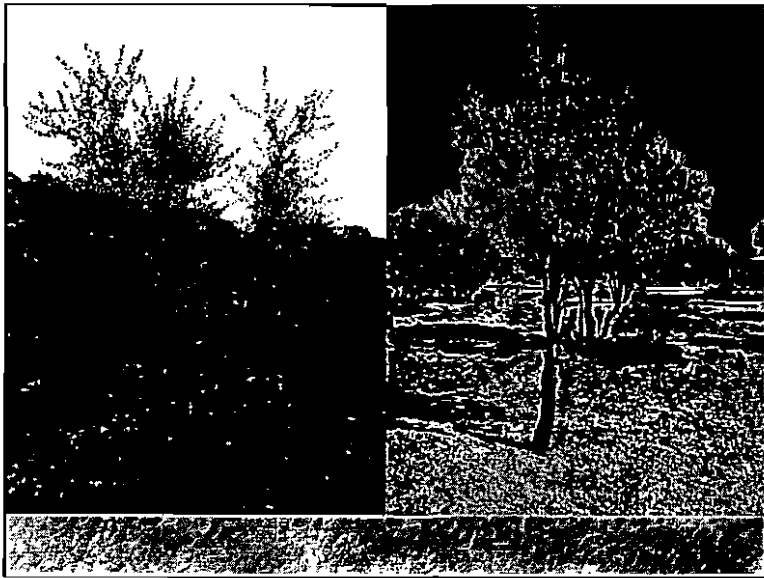
|                |                  |
|----------------|------------------|
| Goteo          | primeros años    |
| Microaspersión | hileras          |
| Aspersión      | parcelas medias  |
| Cañones        | grandes parcelas |
| Inundación     | prohibido        |

# CREACIÓN DE UNA TRUFERA CULTIVADA

8º

## LA PODA





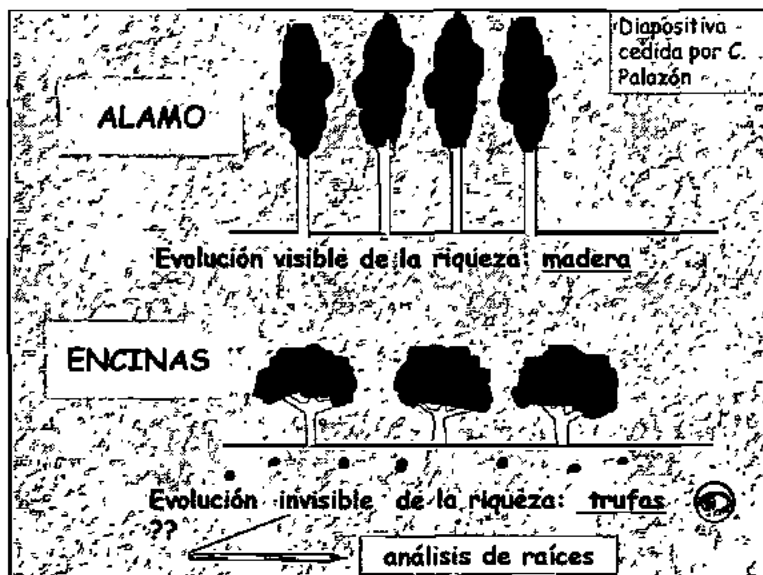


Estudio económico (español)

|                |                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>Regadío</b> | Umbral de rentabilidad: 10,8 kg/ha<br>Competitivo: 15 = 17 kg/ha |
| <b>Secano</b>  | Umbral de rentabilidad: 5,8 kg/ha                                |

Punto débil: incertidumbre respecto al plazo de entrada en producción.

Diapositiva cedida por C. Palazón



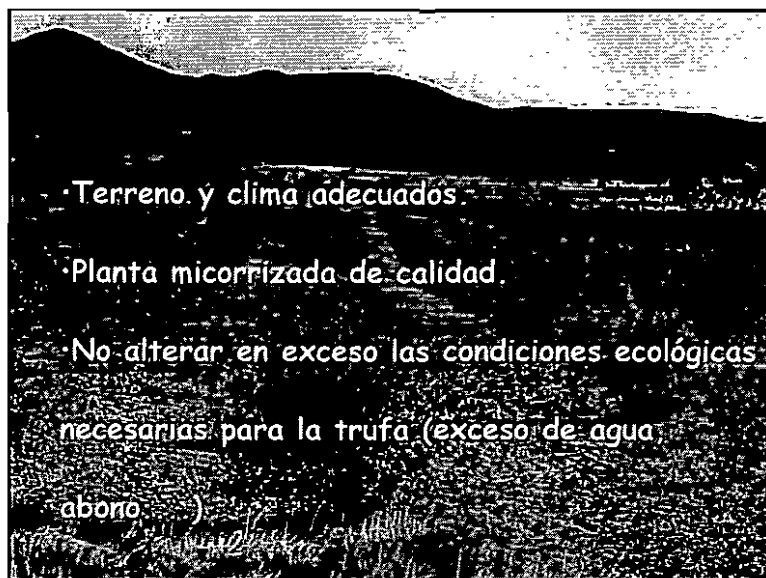
**ANÁLISIS DE LAS**

2 periodos: primavera y otoño

4-10 muestras / árbol

5-15 cm profundidad

Diapositiva cedida por C. Palazón



## MERCADOS Y PRODUCCIONES

- La compraventa de trufa se realiza en **mercados locales** situados en las poblaciones con mayor tradición trufera.
- En general se trata de un mercado **poco transparente**, tanto por la prevención hacia la presión fiscal como para evitar la ampliación del conocimiento del negocio entre personas ajenas.
- Algunos mercados han decaído sensiblemente en los últimos años debido a la **compra a domicilio**.

## MERCADOS ESPAÑOLES



| Provincia   | Población             | Día de la semana |
|-------------|-----------------------|------------------|
| Barcelona   | Vic                   | Sábado           |
|             | Candellés             | Domingo          |
|             | Solomajón             | Viernes          |
| Lérida      | Solana                | Viernes          |
|             | Cull de Nargó         | Domingo          |
|             | Orga                  | Domingo          |
| Castellón   | Artesa de Segre       | Domingo          |
|             | Morella               | Viernes          |
|             | Viadella              | Jueves           |
| Huesca      | Bessan                | Jueves           |
|             | Graus                 | Viernes          |
| Teruel      | Benabarre             | Lunes            |
|             | Belatón Mora Robiclos | Viernes          |
| Guadalajara | Molina de Aragón      | Jueves           |

## MERCADOS Y PRODUCCIONES

- § La característica típica del mercado es que sólo los entendidos, o los que participan en el comercio de trufa, saben que se están realizando transacciones.
- § Cualquier otra persona no se entera de nada. Las trufas no las ve nadie. Sólo los participantes en cada negociación saben que se está produciendo.

## MERCADOS Y PRODUCCIONES

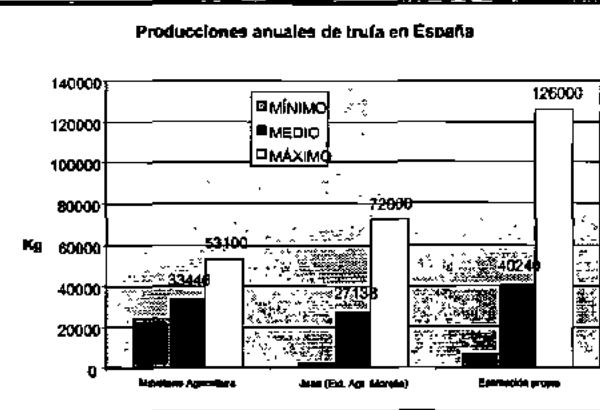
- En las negociaciones de productor a comprador, se valora la **calidad** de la trufa, ya sea porque se vea el producto, o porque se tenga conocimiento y confianza en el productor.
- También se valora la **cantidad**. Una partida de trufa tiene más interés y valor si es cuantiosa.
- Otro factor que se tiene en cuenta es la proximidad de las **Navidades**, en que el valor de la trufa aumenta.



## MERCADOS Y PRODUCCIONES

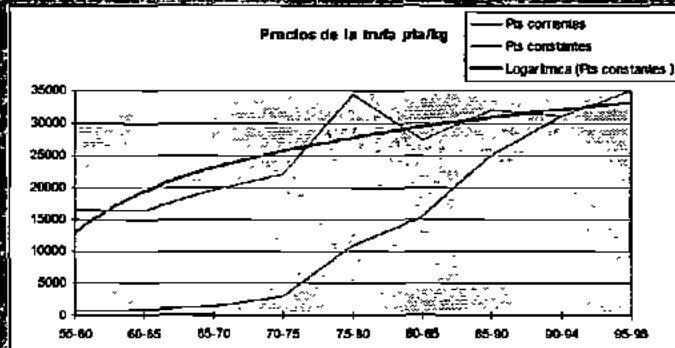
- § La mayor parte de la trufa de los mercados españoles, tiene como destino la frontera francesa, ya sea a través de compradores autónomos o industriales conserveros, que recogen la trufa de sus compradores a comisión.
- § La trufa en fresco, para ser llevada al mercado francés, tiene que ser clasificada. Así lo de buena calidad se vende en general a importadores o industriales franceses. La troceada o de mala calidad se destina a conserva.
- § Parte de la trufa en fresco se coloca en el mercado nacional, en restaurantes; hoteles, pero en muy poca cantidad.

## MERCADOS Y PRODUCCIONES



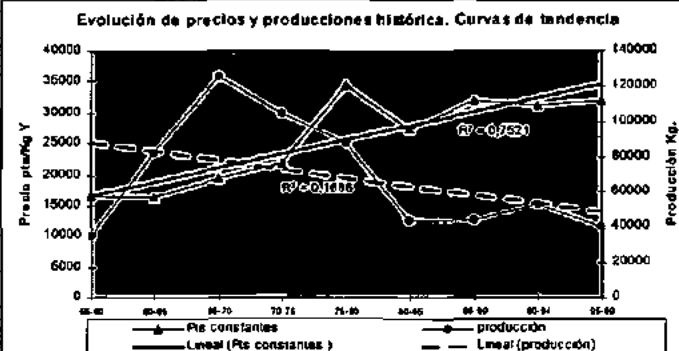
La estimación de las producciones es muy difícil por la falta de transparencia del mercado

## MERCADOS Y PRODUCCIONES



Evolución de precios siempre ha tenido una tendencia ascendente: Valores medios para los mercados españoles

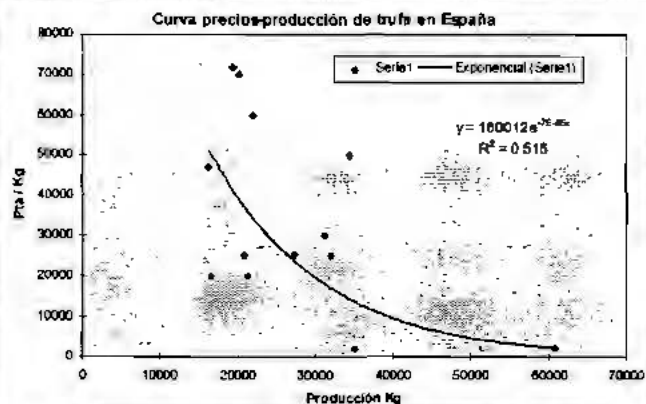
## MERCADOS Y PRODUCCIONES



Las producciones en España tienen una tendencia descendente



## MERCADOS Y PRODUCCIONES



Curva de mercado precios-producciones en pta constantes

## MERCADOS Y PRODUCCIONES

Comparación de precios de la trufa en los mercados de Morilla y Vlc (España) con Carpentras (Francia) Temporada 1996/1997

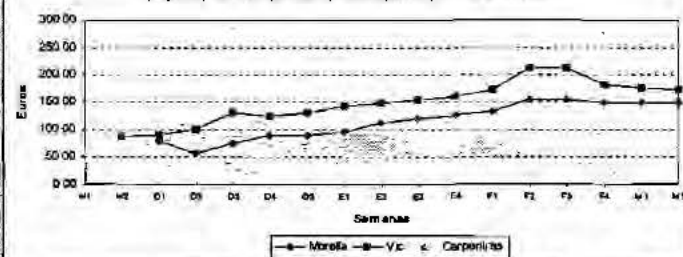


Tabla 11-11

|            | M1  | M2  | M3  | M4  | M5  | M6  | M7  |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Morilla    | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| Vlc        | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| Carpentras | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Comparación de precios en tres mercados

## MERCADOS Y PRODUCCIONES

Las diferencias de precio se deben entre otros motivos a :

- § Venta de trufa sin clasificar con mezcla de especies y sin limpiar
- § Diferente calidad de la trufa: forma y tamaño
- § Proximidad de los mayores mercados

### DIFFERENCES PRICE-PROD TRUFFE PACA LE AG



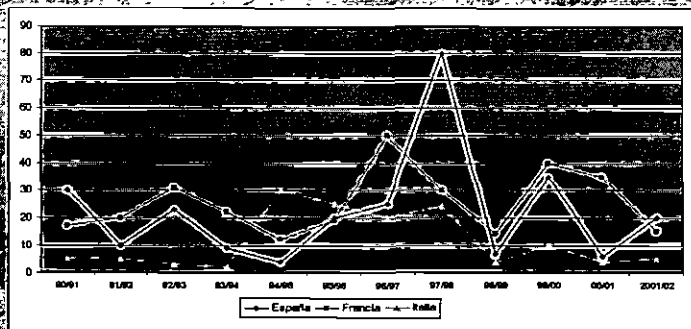
Service des Marchés des Marchés

### CARPENTRAS-TRUFFE-PROD-TRUFFE PACA LE AG

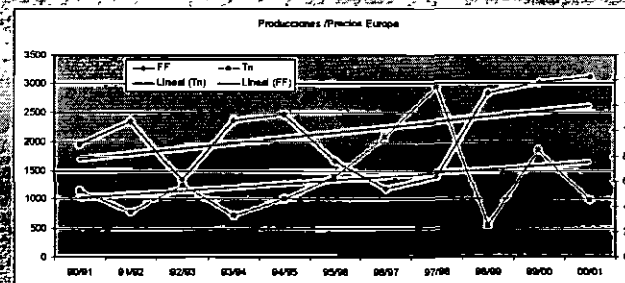


Service des Marchés des Marchés

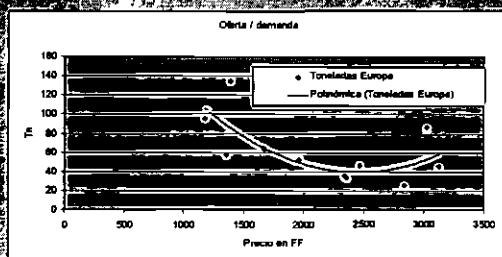
## Producciones de los últimos años



## Evolución precios y producciones en últimos años

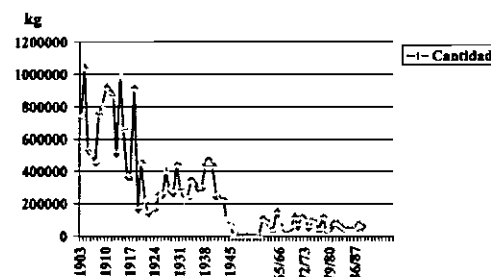


## Curva Oferta - Demanda en Europa



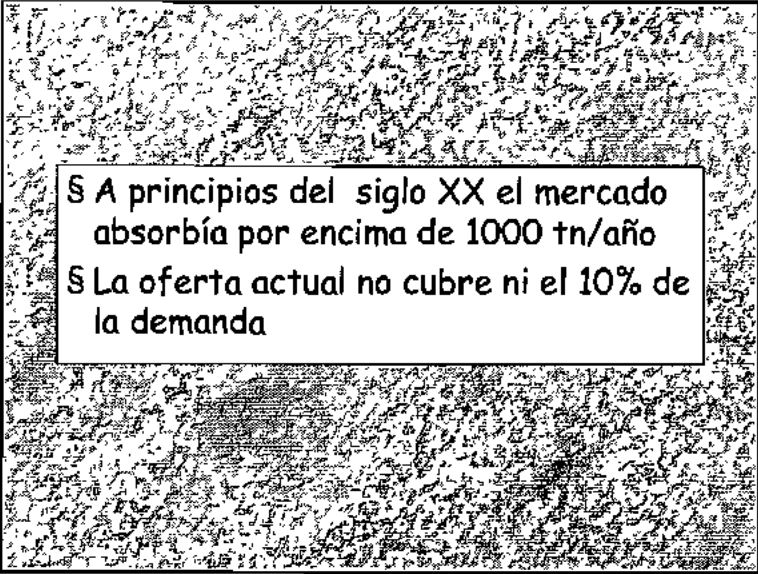
## MERCADOS Y PRODUCCIONES

Gráfico 1. Cantidades comercializadas en los 5 mercados al por mayor en Francia, periodo 1903-1988



La evolución de la producción francesa ha tenido una dramática caída desde 2000 tn en el S XIX a menos de 100 en la actualidad

Sobre Producción en Aragón. Grous, 21-22 de octubre de 1999



§ A principios del siglo XX el mercado absorbía por encima de 1000 tn/año  
§ La oferta actual no cubre ni el 10% de la demanda



**MARCHÉ AUX TRUFFES**  
**OUVERTURE A 14<sup>H</sup> 30**

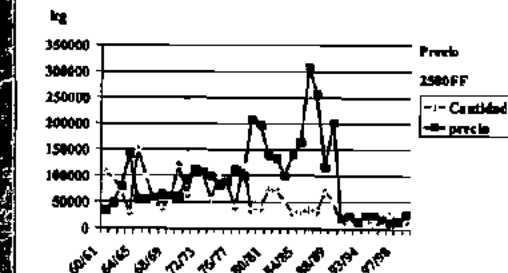


#### MERCADOS Y PRODUCCIONES

- Los principales mercados en origen de trufas en Francia son: Perigueux, Thiviers, Lalbenque, Valreas, Carpentras, Terrason, Richerenches, Aups, etc. Son mercados transparentes.
- En Italia, los mercados en origen están ubicados en: Alba, Spoleto, Sant Angelo, Viso, Norcia, etc.
- El mercado en origen de trufa en Italia, no tiene tanta transparencia como el francés.

## MERCADOS Y PRODUCCIONES

Gráfico 2. Cantidades y precios en los 5 mercados al por mayor en Francia. Periodo 1960/88



PERLIN Robert LA EXPERIENCIA TRUFICOLA FRANCESA 97 Internacional de  
Sobre Truficultura en Aragón Y Grous 21-22 de octubre de 1999



### Ventajas para la truficultura en Chile: Comerciales

- § Oferta de trufa fresca fuera de temporada
- § Disminuir estacionalidad en productos derivados
- § Exportaciones en bloque fuera del mercado menudeo
- § Ventas en conjunto: oferta amplia

## Ventajas para la truficultura en Chile: Ecológicas

- § Diversidad territorial y climática muy elevada que permitiría encontrar el clima y suelo óptimo
- § Cohorte hongos de ectomicorriza posiblemente muy baja y por tanto escasa competencia
- § Nueva Zelanda : trufera de 30 árboles establecida en 1988 en 2001 produjo 12 kg . Suelo volcanico pH 6.2 enmendado 7.9 (Chevalier , Le trufficulteur n° 42)

Muchas gracias por su  
atención



## Proyecto TRUFICULTURA

"Desarrollo de las bases tecnológicas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario"

### Financiamiento

Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.

### Participantes:

Universidad Católica del Maule, Chile.

Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo, España

Fecha Inicio: Noviembre 2001

Fecha Término: Octubre 2005



## MARCO DEL PROYECTO

- Opción de incorporar un cultivo con buena rentabilidad en pequeñas superficies
- Posibilidad para implantar el cultivo en suelos de baja productividad agrícola (límite entre forestal y agrícola).
- La drástica disminución de las producciones naturales en Europa y oferta de trufa en período contra temporada  
⇒ Gran potencial de mercado para una posible producción en Chile

## MARCO DEL PROYECTO

- Costo de envío bajo en relación a los precios del producto
- *Quercus robur*, *Q. ilex* y *Corylus avellana* presentan buena adaptación a condiciones agroecológicas locales.
- Experiencias en otras regiones fuera de su distribución natural en Europa: Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Israel y Sudáfrica.
- Posibilidad de revalorización de especies nativas (*Nothofagus* spp.)

## OBJETIVO GENERAL



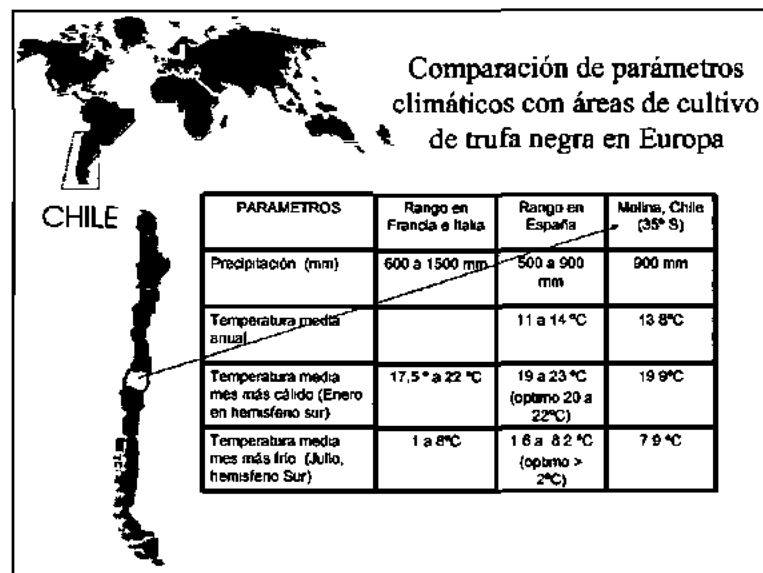
Desarrollar e implementar tecnologías adecuadas para el cultivo de trufa negra (*Tuber melanosporum*, Vitt.) en Chile, como alternativa productiva y comercial para los pequeños y medianos productores del sector silvoagropecuario

### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

1. Micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt., en condiciones semi-controladas para las especies:
  - *Quercus ilex* (encina)
  - *Quercus robur* (encino común)
  - *Corylus avellana* (avellano europeo)
2. Ensayos de inoculación con *Tuber melanosporum* en especies nativas del género *Nothofagus*.
3. Control cualitativo y cuantitativo de la micorrización de plantas con *Tuber melanosporum*, Vitt.

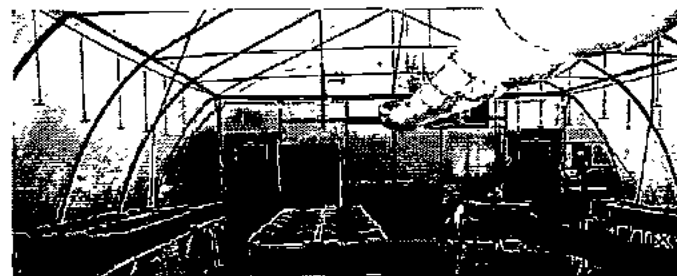
### ACTIVIDADES PRINCIPALES DEL PROYECTO

4. Evaluación del potencial de desarrollo de *Tuber melanosporum*, Vitt. como un cultivo en Chile.
5. Seguimiento y evaluación de la micorrización en unidades experimentales de campo.
6. Transferencia de tecnologías a productores, instituciones, profesionales y técnicos del sector



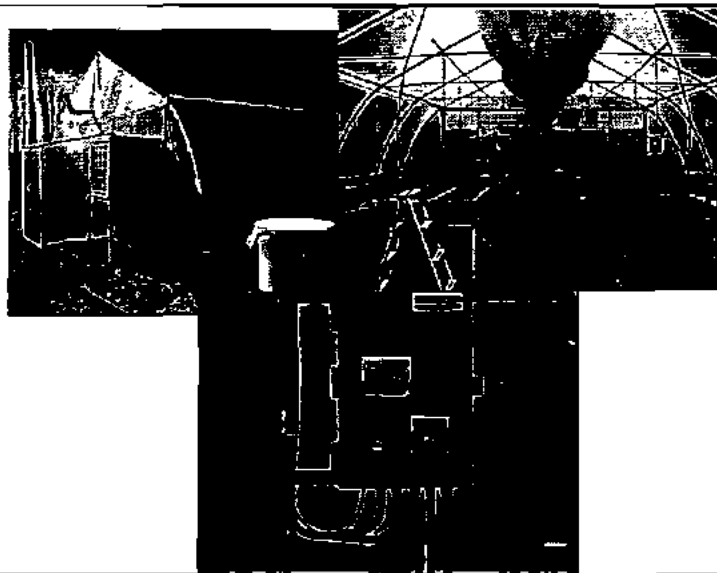
## AVANCES DEL PROYECTO

1. Implementación de invernadero y sistema productivo
2. Obtención del material genético base:
  - Inóculo de Trufa puro (*Tuber melanosporum*, Vitt.)
  - Semillas (*Q. ilex*, *Q. robur*, *Corylus avellana* y *Nothofagus sp.*)
3. Cultivo y controles del material vegetal previo a inoculación
4. Proceso de inoculación
5. Selección de predios para establecer las unidades experimentales de campo
6. Establecimiento de unidades experimentales



### Controles preventivos para la operación:

- Suministro y calidad de agua de riego
- Aislación del suelo
- Control de variables ambientales (T<sup>o</sup> y humedad)



## Obtención del inóculo

### ACCIONES CLAVES:

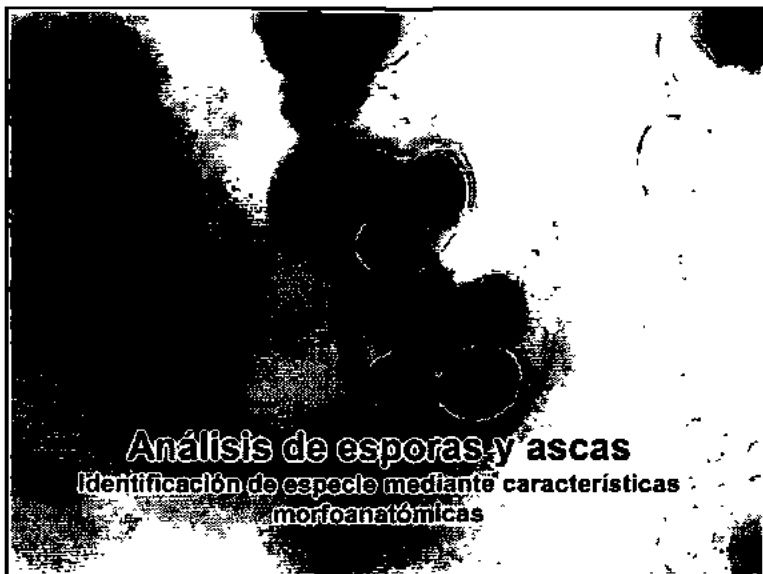
- Confiabilidad del suministro de trufa (España)
- Recolección del material en campo (Período adecuado)
- Control de calidad y pureza del material
- Preparación e internación del inóculo



### Recolección de trufas para internar a Chile (El Toro, Castellón, España)



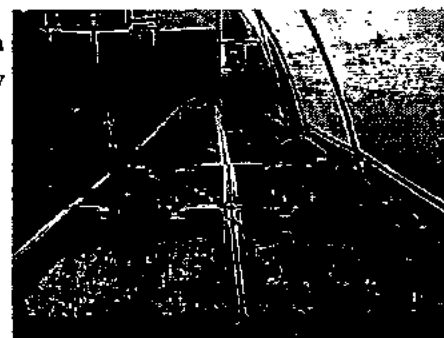
### Control de pureza del inóculo



### Cultivo de plantas previo a inoculación

#### ASPECTOS CLAVES:

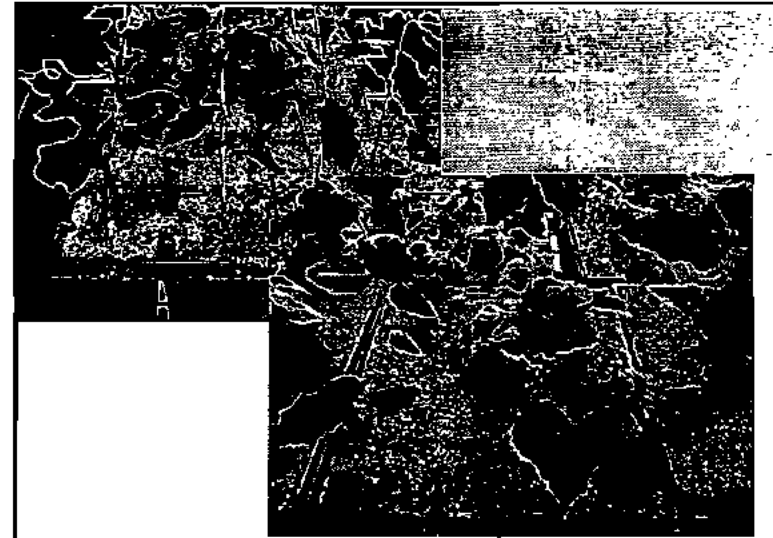
- Condiciones de asepsia
- Control del ambiente y
- Sistema de cultivo
- Control del material vegetal de cara a la inoculación con trufa



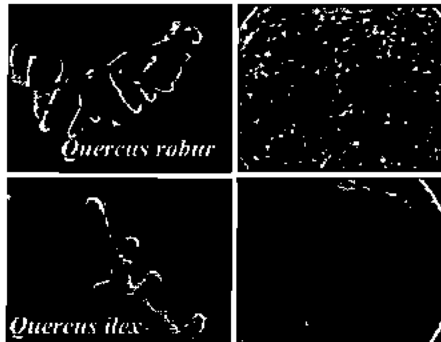
## Proceso de inoculación

### ASPECTOS CLAVES:

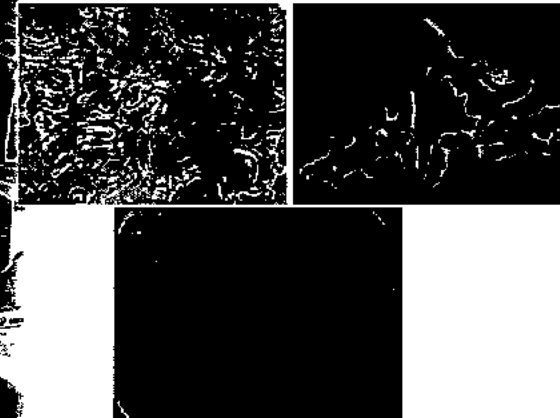
- Condiciones de asepsia (Substrato, contenedores, utensilios y agua de riego)
- Control del ambiente (Temperatura y humedad)
- Método de inoculación y transplante



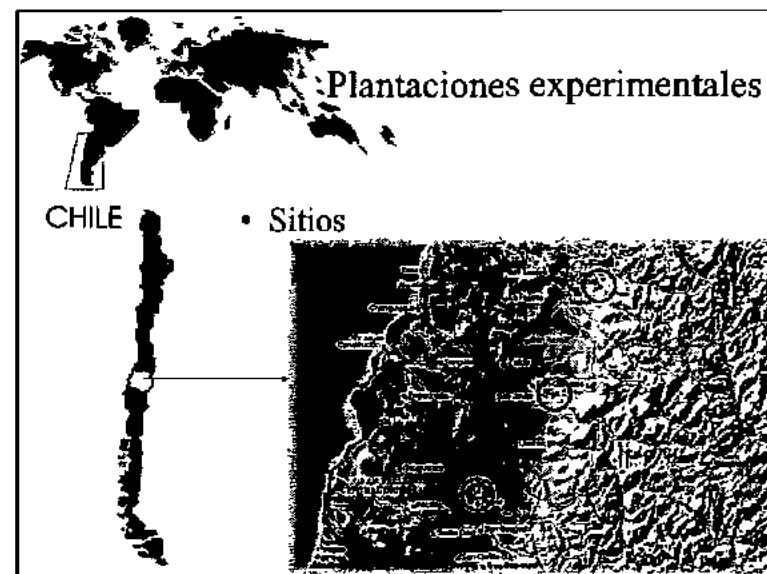
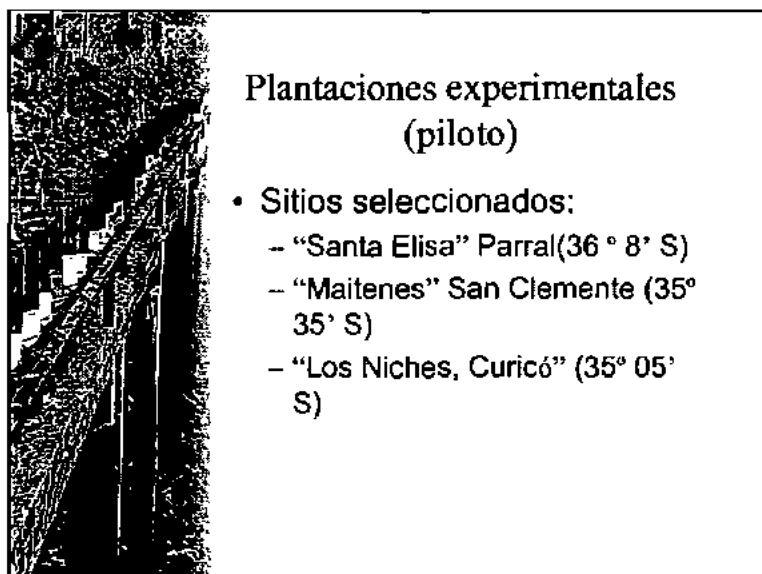
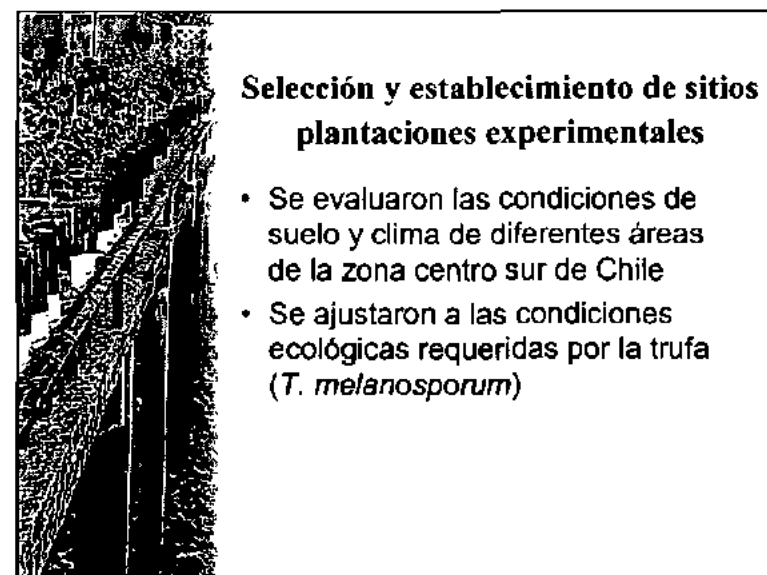
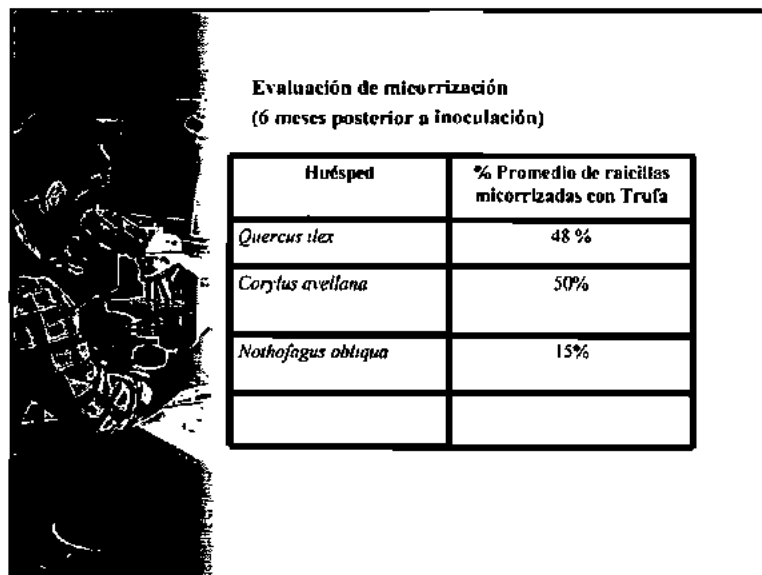
## Análisis de micorrizas



## Análisis de micorrizas

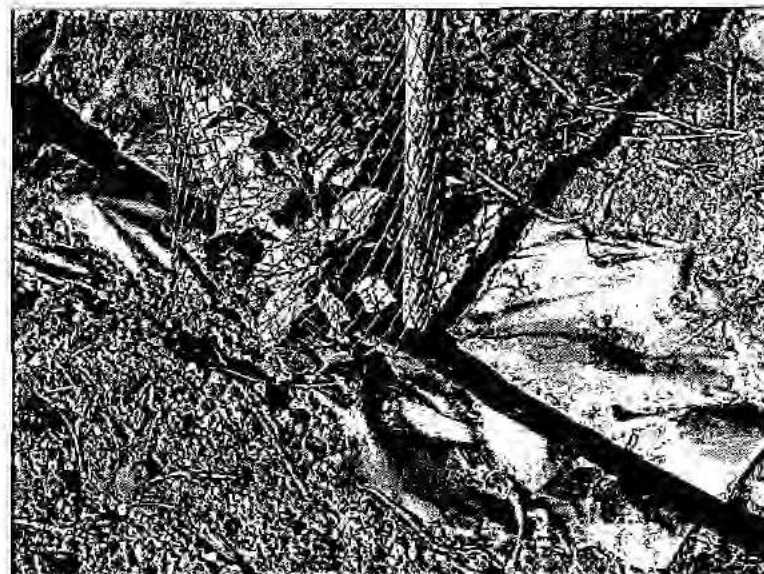
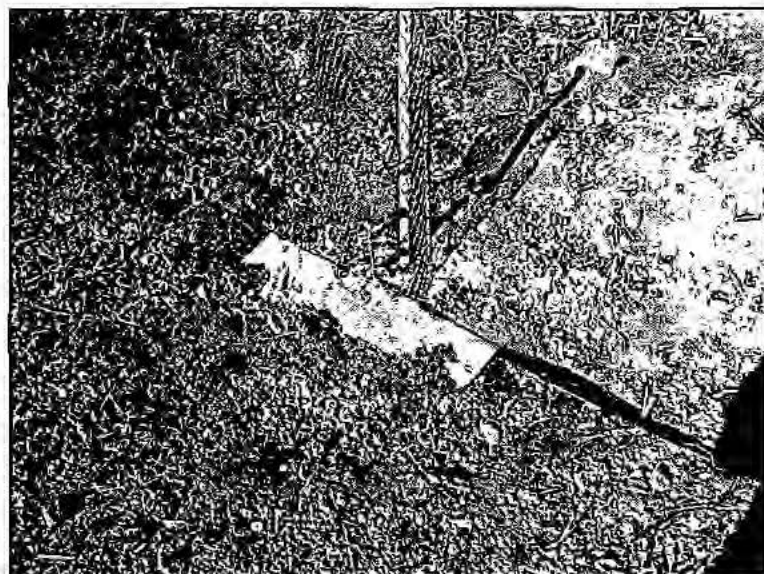


Rango de características de micorriza de *T. melanosporum*



### Preparación de sitios y establecimiento

- Consistió principalmente en labores mecánicas poco profundas y aplicación de enmienda con cal para aumentar el pH de los suelos
- Se aplicó aproximadamente una proporción de 15 ton. por hectarea de cal fina para ajustar el pH.
- Recientemente, se han establecido las primeras plantaciones experimentales, bajo diferentes condiciones ambientales y de cultivo.



MUCHAS GRACIAS POR  
SU ATENCIÓN