CONVENIO DE COLABORACIÓN

CC13-068

ENTRE

EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA

Y

EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN (CITA),

PARA

LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN "INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y DE LA MICROBIOTA DEL SUELO EN LA FRUCTIFICACIÓN DE LA TRUFA NEGRA"

Zaragoza, 22 de diciembre de 2015

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA Y EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN, PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN "INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y DE LA MICROBIOTA DEL SUELO EN LA FRUCTIFICACIÓN DE LA TRUFA NEGRA"

En Zaragoza, a 22 de diciembre de 2015

REUNIDOS

De una parte, **D. Manuel Lainez Andrés,** Director del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (en lo sucesivo INIA), con CIF Q-2821013-F, con sede en Madrid, Ctra. de La Coruña, km 7,5, en representación del mismo en virtud de la Orden ECC/1392/2012, de 8 de junio, por la que se dispone su nombramiento, actuando conforme a las atribuciones que le confiere el artículo 12.2.d) del Estatuto del INIA, aprobado por Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre, modificado por Real Decreto 718/2010, de 28 de mayo.

Y de otra parte, **D. José Antonio Domínguez Andreu**, Director Gerente del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (en lo sucesivo la CITA), con CIF Q-5000823-D, con sede en Zaragoza, Avda. de Montañana 930, en representación del mismo en virtud de su nombramiento por el Decreto 190/2015, de 29 de julio, del Gobierno de Aragón (Boletín Oficial de Aragón nº 146 de 30 de julio), de conformidad con lo dispuesto en el art. 9.1 de la Ley de Cortes de Aragón 29/2002, de 17 de diciembre, de creación del citado Centro.

Actuando ambos en razón de sus respectivas competencias y reconociéndose poderes y facultades suficientes para formalizar el presente convenio,

EXPONEN

Primero.- Que el INIA, organismo autónomo adscrito al Ministerio de Economía y Competitividad por el Real Decreto 345/2012, de 10 de febrero, por el que se desarrolla su

estructura orgánica básica, actúa conforme a lo establecido en el Real Decreto 1951/2000, de 1 de diciembre, por el que se aprueba el Estatuto del Organismo, modificado por Real Decreto 718/2010, de 28 de mayo. De acuerdo con los apartados d) y e) del artículo 2.2. de dicho Estatuto, entre las actividades que el INIA puede llevar a cabo para el cumplimiento de las funciones que tiene encomendadas están las de "promover la cooperación nacional e internacional en materia de investigación agraria y alimentaria, en particular con las Comunidades Autónomas" así como "establecer Convenios con organismos públicos y privados, tanto nacionales como internacionales, para la realización de proyectos de investigación y otras actividades de carácter científico y tecnológico".

Segundo.- Que el CITA fue creado por la Ley 29/2002, de 17 de diciembre, definiéndose en su artículo 1 como una entidad de derecho público, dotada de personalidad jurídica, de autonomía administrativa y plena capacidad de obrar. Está adscrito al Departamento de la Administración de la Comunidad Autónoma de Aragón con competencia en materia de investigación agroalimentaria, en este momento el Departamento de Innovación, Investigación y Universidad, de acuerdo con el Decreto de 5 de julio de 2015 de la Presidencia del Gobierno de Aragón. Según la mencionada Ley, el CITA tiene, entre sus funciones, las siguientes: promover y realizar programas de investigación y desarrollo, propios o concertados con terceros, relacionados con los sectores agroalimentario y forestal; potenciar la innovación en el sector agroalimentario; y contribuir a la protección y conservación de los recursos genéticos del sector agrario aragonés. Para ello dispone de equipos de investigación capacitados para la realización de proyectos de investigación.

Tercero.- Que tanto el CITA como el INIA, desde sus respectivas competencias investigadoras, consideran de gran interés investigar sobre la productividad del cultivo de la trufa negra, y en particular sobre la influencia de las propiedades físicas y de la microbiota del suelo en su fructificación, investigación que se encuadra en el marco de una serie de actuaciones que pretenden potenciar los recursos autóctonos, recogidas en el II Plan Autonómico de Investigación, Desarrollo y Transferencia de Conocimientos de Aragón, aprobado por Decreto 263/2004, de 30 de noviembre, del Gobierno de Aragón.

Por todo ello, las partes acuerdan suscribir el presente Convenio de colaboración, que se regirá conforme a las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA.- Objeto del convenio

El objeto del presente convenio es la colaboración de ambas partes en la realización del proyecto de investigación titulado "Influencia de las propiedades físicas y de la microbiota del suelo en la fructificación de la trufa negra", de acuerdo con la memoria técnica que se adjunta como Anexo.

SEGUNDA.- Actuaciones de las partes

El INIA aportará apoyo científico-técnico en el desarrollo del proyecto, colaborando específicamente en el establecimiento de una escala temporal de la dinámica poblacional de las comunidades fúngicas asociadas en la zona de suelo cercana a la fructificación, dentro del objetivo 3 del proyecto.

La responsable del convenio en el INIA será la Dra. Mª Inmaculada Larena Nistal, del Departamento de Protección Vegetal.

El CITA, por su parte, será el responsable de la coordinación general del proyecto y de la ejecución de las actividades relacionadas con la determinación de la influencia de distintos tratamientos sobre la producción de trufa negra, tanto cuantitativa como cualitativamente, del establecimiento de la relación entre la cantidad de estructuras vegetativas de trufa negra: micelio extrarradical (análisis de ácidos nucleicos) y ectomicorrizas y la producción de carpóforos, y del establecimiento de una escala temporal de sucesos en la zona de suelo cercana a la fructificación, que incluya la aparición de primordios y la presencia de artrópodos relacionados con la dispersión de la trufa.

El responsable del convenio en el CITA será el Dr. Sergio Sánchez Durán.

TERCERA.- Evaluación económica

La evaluación económica total para el periodo de duración del Convenio es de **TRESCIENTOS TREINTA Y DOS MIL QUINIENTOS NOVENTA Y CINCO EUROS (332.595 €)**.

La valoración de la aportación total que realiza el INIA es de DOSCIENTOS CINCUENTA Y SIETE MIL CIENTO QUINIENTOS NOVENTA Y CINCO EUROS (257.595 €), de los cuales 209.535 € corresponden a la aportación dineraria al CITA para contribuir al desarrollo de las actividades del convenio.

El presupuesto de las actividades a realizar por el INIA es el siguiente:

Concepto	2015	2016	2017	2018	Total (euros)
Costes de ejecución	6.675,00	13.350,00	13.350,00	6.675,00	**40.050,00**
Costes indirectos (20%)	1.335,00	2.670,00	2.670,00	1.335,00	**8.010,00**
Aportación al CITA	34.922,50	69.845,00	69.845,00	34.922,50	**209.535,00**
TOTAL	**42.932,50**	**85.865,00**	**85.865,00**	**42.932,50**	**257.595,00**

Los costes propios de ejecución del INIA se financiarán con cargo al Capítulo 2 de su Presupuesto para los años 2015, 2016, 2017 y 2018.

El presupuesto total de las actividades a realizar por el CITA es el siguiente:

	Concepto	2015	2016	2017	2018	**Total (euros)**
Aportación propia	Personal propio	12.500,00	25.000,00	25.000,00	12.500,00	**75.000,00**
Aportación del INIA	Costes de ejecución (personal contratado, material fungible, desplazamiento y dietas)	29.102,09	58.204,17	58.204,17	29.102,08	**174.612,51**
	Costes indirectos (20%)	5.820,41	11.640,83	11.640,83	5.820,42	**34.922,49**
TOTAL		**47.422,50**	**94.845,00**	**94.845,00**	**47.422,50**	**284.535,00**

La aportación dineraria del INIA, con cargo a la partida presupuestaria 27.104.467D.751.05, o la equivalente que la sustituya en ejercicios posteriores, se transferirá al CITA de acuerdo con el siguiente calendario:

Fecha de abono prevista	Diciembre 2015	Diciembre 2016	Diciembre 2017	Julio 2018
Aportación	34.922,50 €	69.845,00	69.845,00	34.922,50
Ejecución de actividades	Desde la fecha de firma a 15.11.2015	De 16.11.2015 a 15.11.2016	De 16.11.2016 a 15.11.2017	De 16.11.2017 a la finalización del periodo de ejecución

Estos pagos se realizarán tras la presentación por parte del CITA del correspondiente informe de seguimiento y la justificación del gasto realizado hasta el 15 de noviembre de los años 2015, 2016 y 2017 respectivamente, y hasta la finalización del periodo de ejecución de actividades (tres años desde la fecha de la firma) para el último pago, de acuerdo con la redacción del artículo 21 de la Ley 47/2003, General Presupuestaria, establecida en la Ley de Presupuestos del Estado de 2013 (BOE nº 312, de 28 de diciembre de 2012). Esta justificación consistirá en un certificado de la Dirección Gerencia del CITA en el que se especifiquen, detallados por conceptos, los gastos efectuados.

En el caso de que la cantidad justificada por el CITA fuera inferior a la prevista para alguna anualidad, el INIA transferirá la cantidad realmente justificada, sin perjuicio de que la cantidad remanente pueda ser transferida en anualidades posteriores, previa justificación.

Estas aportaciones se ingresarán en la cuenta corriente nº ES78/2085/1425/58/0330114302 de la entidad Ibercaja, a nombre del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

CUARTA- Comisión de Seguimiento

Se establecerá una Comisión de Seguimiento con objeto de examinar la marcha de los trabajos, revisar su programación, si es necesario, y resolver las discrepancias, dudas o conflictos que se presente en la ejecución de las actividades del Convenio.

La Comisión de Seguimiento se reunirá siempre que cualquiera de las partes lo estime oportuno y en un plazo máximo de 15 días tras la solicitud de convocatoria de cualquiera de las partes. Esta Comisión estará formada por dos representantes de cada una de las partes. Los representantes del INIA serán la Subdirectora General de Investigación y Tecnología o persona en quien delegue, que la presidirá, y la coordinadora del convenio en el INIA. Los representantes del CITA serán la Directora de Investigación y el investigador responsable del proyecto. Las decisiones en el seno de la Comisión se tomarán por unanimidad, siendo necesaria para su válida constitución la presencia de al menos un representante de cada parte.
La Comisión de Seguimiento se regulará por lo dispuesto en el Capítulo II de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, sobre órganos colegiados, y por lo previsto en el presente Convenio de colaboración.

QUINTA.- Información entre las partes.

Cada parte se compromete a mantener informada a la otra parte firmante del presente Convenio, tanto de los resultados de los trabajos científico-técnicos alcanzados en su realización, como de cualquier extremo relevante para la consecución del mismo.

Será necesario obtener previamente el acuerdo entre las partes para informar a terceros sobre el contenido y el desarrollo del Convenio y haciendo mención expresa a la existencia del mismo.

SEXTA.- Propiedad de los resultados.

Los resultados obtenidos tendrán carácter reservado y ambas partes mantendrán la confidencialidad sobre la información generada durante la ejecución de los trabajos del Convenio.

Los posibles derechos de propiedad industrial e intelectual, u otros de análoga naturaleza, así como los beneficios que surjan de las actuaciones del presente Convenio, serán compartidos por las dos entidades en función de sus respectivas aportaciones.

SÉPTIMA.- Régimen de personal

Cuando el personal de una de las partes desarrolle alguna actividad en una sede perteneciente a la otra, deberá respetar sus normas de funcionamiento interno sin que en

ningún caso se altere su relación jurídica ni adquiera derecho alguno frente a ella, quedando, en todo caso, en el ámbito de la organización y dirección de la institución a la que pertenezca.

Serán de cuenta de cada parte, la cobertura de las obligaciones en materia de seguridad social, mutualidad, seguro de accidentes y todo tipo de cargas y gravámenes relativos al personal que aporten para la realización y desempeño de los trabajos objeto del presente Convenio. También serán responsables de la cobertura de la responsabilidad civil en que pudieran incurrir durante el desarrollo de los trabajos previstos en el mismo.

OCTAVA: Extinción

La extinción del Convenio será por conclusión o cumplimiento del mismo o por resolución de las partes. Son causas de resolución:

- El incumplimiento de cualquiera de las cláusulas contenidas en el mismo. El incumplimiento deberá ser comunicado a la parte incumplidora, en el plazo máximo de un mes desde que se tenga conocimiento del incumplimiento, mediante escrito fehaciente, concediéndose un plazo de un mes para que la parte incumplidora alegue lo que a su derecho convenga. Transcurrido este plazo, y a la vista de las alegaciones, la parte no incumplidora podrá resolver el convenio.
- El acuerdo de las partes.

En caso de resolución anticipada, se finalizarán las actividades que estuvieran en ejecución, sin perjuicio de las indemnizaciones procedentes por los daños y perjuicios ocasionados en caso de resolución por incumplimiento.

NOVENA.- Comienzo de efectos y duración del Convenio

El presente Convenio surtirá efectos desde la fecha de su firma y las actividades se realizarán durante tres años. El convenio finalizará una vez efectuada la última aportación del INIA al CITA. No obstante podrá ser objeto de adendas y de prórrogas, cada vez por un año hasta un máximo de dos veces, por acuerdo de las partes antes de su finalización, mediante la suscripción de la correspondiente Acta de Prórroga.

DÉCIMA.- Régimen Jurídico y resolución de conflictos

El presente Convenio tiene su fundamento en lo establecido en el artículo 34 de la Ley 14/2011, de 1 de junio, de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación y, de acuerdo con lo previsto en el artículo 4.1.c) del texto refundido de la Ley de Contratos del Sector Público, aprobado por Real Decreto Legislativo 3/2011, de 14 de noviembre, queda excluido del ámbito de esta Ley, siéndole de aplicación en defecto de normas específicas, los principios de dicho texto legal para resolver dudas y lagunas que pudieran producirse.

Las cuestiones litigiosas a que pueda dar lugar la interpretación, modificación, efectos o resolución del presente Convenio serán resueltas en el seno de la Comisión de Seguimiento. Si no hubiera acuerdo, las discrepancias que surjan serán del conocimiento y competencia de los Juzgados y Tribunales del orden jurisdiccional de lo contencioso-administrativo, con arreglo a la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de dicha jurisdicción.

En prueba de conformidad, y para la debida constancia de todo lo convenido, ambas partes firman el presente Convenio en duplicado ejemplar y en todas sus hojas, en el lugar y fecha al principio indicados.

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA

MANUEL LAINEZ ANDRÉS

EL DIRECTOR GERENTE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN

JOSÉ ANTONIO DOMÍNGUEZ ANDREU

ANEXO 1
INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y DE LA MICROBIOTA DEL SUELO EN LA FRUCTIFICACIÓN DE LA TRUFA NEGRA
MEMORIA TÉCNICA

Antecedentes

El cultivo y la recolección de la trufa negra está adquiriendo en España un carácter excepcional, no solo por la extraordinaria aptitud de gran parte del territorio nacional al cultivo de la trufa negra sino porque genera grandes valores económicos, ambientales y socio-culturales. El desarrollo de esta actividad supone un complemento de renta en áreas deprimidas o marginadas, ante los precios elevados que alcanza el producto dentro de un mercado sin excedentes y con una gran demanda.

La posibilidad de establecer plantaciones cultivadas para la producción de trufa, justo en aquellas zonas marginales donde cualquier cultivo resulta difícil o imposible, está contribuyendo a la forestación de superficies agrarias, con la introducción de especies forestales autóctonas, frondosas micorrizadas, como la encina, el quejigo o el roble, lo que evita la erosión, contribuye a la formación de paisaje y favorece la formación del suelo. Estas características citadas contribuyen a que su cultivo esté subvencionado por la mayoría de las administraciones, locales, autonómicas o central, así como por los fondos europeos, con la posibilidad de obtener ayudas a la diversificación agraria de las zonas rurales, tanto del objetivo 1 como las del objetivo 5, e incluso la de ser apoyado por la iniciativa Comunitaria LEADER, como cultivo de carácter ambiental e innovador. El gancho final está en su condición de producto agrícola de carácter ecológico y natural, al no necesitar su cultivo ningún apoyo químico o fitosanitario.

Es innegable que el conocimiento de las técnicas de micorrización a gran escala, por parte del sector viverista, ha provocado una gran expansión de los cultivos dedicados a la producción de trufa negra que alcanzan, en nuestro país, la cifra estimativa de 6.000 ha, frente a las 3.000 ha que existían hace cinco años. La mayor información técnica existente, las ayudas y subvenciones anteriormente mencionadas, la existencia de Asociaciones de truficultores, las modificaciones producidas en el ámbito político-geográfico de la Unión Europea con un reparto más complicado de las ayudas y con unos horizontes difíciles en torno a la PAC, en lo que se refiere a cultivos extensivos de secano, han sido el desencadenante para este gran desarrollo de la truficultura moderna, a partir de plantaciones, constituyéndose en una alternativa posible y rentable.

Sin embargo este gran desarrollo experimentado no ha ido acompañado de los avances científicos en torno a las grandes incógnitas que la truficultura ha planteado desde sus inicios, como son los factores bióticos y abióticos y su influencia en la producción de cosecha. Cuando un truficultor planta árboles micorrizados, desconoce el momento de entrada en producción y el rendimiento que obtendrá una vez iniciada. En el momento actual los rendimientos de las truferas, bien llevadas, se sitúan entre 2 y 100 kilos por hectárea.

Desde hace varios años, se ha extendido entre el sector trufero español una práctica agronómica conocida como "pozos", "nidos" o "aportes". Consiste en incorporar diferentes tipos de sustratos en zonas puntuales alrededor de los árboles de las plantaciones, compuestos por materia vegetal compostada y otros elementos inertes que modifican las propiedades físico-químicas de esa zona. En algunos casos comienzan a realizar estos aportes en edades muy tempranas de la plantación, añadiendo en la mayoría de las ocasiones esporas de trufa. La intención es doble: pequeños movimientos de tierra junto con la adición de un sustrato ahueca el terreno y proporciona una zona más aireada hacia la que las raíces micorrizadas podrían desplazarse en masa incrementando las

posibilidades de que las trufas se formen en esos lugares. Su forma sería además más esférica, debido a la ausencia de piedras y o cualquier otro tipo de resistencia física a su crecimiento, por lo que su valor en el mercado aumentaría. El otro aspecto es que aportar esporas podría incrementar la micorrización en los pozos y disminuir la contaminación de ápices radicales por otras especies ectomicorrícicas.

Existe cierto consenso en el sector sobre las virtudes de esta práctica para producir mayores cosechas y de mayor calidad, sin embargo ningún estudio ha demostrado su efectividad ni ha intentado comprender los mecanismos por lo que funciona. Pensamos que la gran cantidad de recursos que invierten los agricultores, tanto en tiempo como económicos, principalmente por la propia trufa que emplean es justificación suficiente para este Proyecto de Investigación.

La realización de pozos permite disponer de un volumen de suelo pequeño (más o menos 2 litros) y perfectamente localizado con mayor probabilidad que en el resto de puntos de una plantación de que en él tenga lugar la unión de talos (sexualidad), el inicio de la formación de trufas y la maduración de las mismas.

Además, existe un gran desconocimiento sobre los microorganismos que comparten hábitat con la trufa negra, sus interacciones y sobre si alguno de ellos es capaz de influir positivamente en su desarrollo. Recientemente se han agrupado cierto número de especies bacterianas dentro de las MHB (Mycorrhizal Helper Bacteria), por compartir la propiedad de favorecer la colonización de las raíces por los hongos micorrícicos (KREY-FLETT et al., 2007, SMITH y READ, 2008; DOMINGUEZ et al., 2012). El proceso de micorrización de plántulas en vivero, depende en gran parte de la obtención de plántulas libres de micorrizas y su posterior cultivo sobre sustratos desinfectados, con el fin de que la única presencia ectomicorrícica sea la de la hongo inoculado (*T. melanosporum*) (PALAZÓN Y BARRIUSO, 2007). No obstante, dicha desinfección podría eliminar algunas poblaciones de microorganismos beneficiosos que, en caso de identificarse, serían susceptibles de ser incorporados a los sustratos desinfectados para mejorar la calidad de los plantones micorrizados (PALAZÓN et al., 2007).

En el plano económico es necesario hacer unas consideraciones previas a un tema como el de la producción de trufa negra, muy demonizado a causa del oscurantismo de sus circuitos comerciales. En primer lugar hay que hacer referencia a la insuficiencia de la producción de acuerdo con la demanda. A pesar de los esfuerzos de los productores, la demanda europea y mundial de trufas de calidad no se cubre en absoluto. A comienzos del siglo pasado, el mercado absorbía, sin ningún tipo de problemas, cantidades del orden de las mil toneladas, teniendo en cuenta la precariedad de los medios de transporte de entonces y los niveles de vida tan inferiores a los actuales. En los años climáticamente normales, la producción europea y/o mundial de trufa negra de invierno (*T. melanosporum*) asciende a una cantidad cercana a las 100 toneladas, lo que representa solamente un 10% de la demanda a nivel mundial. Indicaremos que, aunque se comienza a intentar su cultivo en otros países del mundo como EE.UU, Australia, Nueva Zelanda, Chile, la trufa negra sólo se produce en cantidades apreciables en la zona mediterránea del continente europeo.

Las consideraciones anteriores convienen que el mercado potencial de la trufa, con unas cantidades mínimas de 1000 toneladas y a un precio medio de 460 euros/kg, representa una cifra cercana a los 460 millones de euros, concurridos casi en exclusividad por Italia, Francia y España.

La producción de trufa negra depende cada vez en mayor medida de las plantaciones de árboles micorrizados, con una recesión preocupante de la producción silvestre. Este hecho, en sí problemático, confiere una mayor responsabilidad hacia la promoción y el desarrollo de los conocimientos técnicos y científicos que posibiliten el ejercicio de esta actividad agrícola-forestal, importante por sí misma y por la confluencia de otras actividades económicas como las empresas

viveristas, las empresas de restauración y sus rutas gastronómicas, que englobarían actividades importantes de turismo rural.

Por último hay que significar que la truficultura constituye un medio de revalorizar los terrenos dedicados a dicho fin, la mayoría de las veces en situación de abandono, y que el potencial español en ese sentido es muy amplio, con muchos miles de hectáreas que afectan a terrenos forestales o escasamente explotados, favorables por clima y suelo al desarrollo de dicha actividad.

En lo referente a la producción silvestre hay que señalar que la trufa negra aparece en los bosques calcícolas españoles. Su aprovechamiento se ajusta a los requerimientos de un desarrollo sostenible, es uno de los recursos forestales mediterráneos más rentables y se localiza principalmente en comarcas de montaña, con pocas alternativas agroforestales rentables. La conservación de la producción trufera en estos bosques es importante si se quiere fomentar la vinculación de las poblaciones locales a sus espacios naturales.

Objetivos del proyecto

Se pretende principalmente comprender la influencia de la práctica de "pozos" sobre la producción trufera y aprovecharlos para estudiar la zona de fructificación con mayor detalle.

Más concretamente:

Objetivo 1.- Determinar la influencia sobre la producción de trufa negra, cuantitativa y cualitativa, y sobre el desarrollo del hongo de los siguientes tratamientos:

- movimientos de tierra puntuales
- adición de materia orgánica
- incorporación de esporas
- incorporación microorganismos propios de carpóforos y ectomicorrizas de la especie

Objetivo 2.- Conocer la relación entre la cantidad de estructuras vegetativas de trufa negra: micelio extraradical (análisis de ácidos nucleicos) y ectomicorrizas y la producción de carpóforos.

Objetivo 3.- Establecer una escala temporal de sucesos en la zona de suelo cercana a la fructificación que incluya: aparición de primordios, presencia de artrópodos relacionados con la dispersión de la trufa y dinámica poblacional de las comunidades fúngicas asociadas.

Metodología de la investigación

Objetivo 1.- Determinar la influencia sobre la producción de trufa negra, cuantitativa y cualitativa, y sobre el desarrollo del hongo de los siguientes tratamientos:

- movimientos de tierra puntuales
- adición de materia orgánica
- incorporación de esporas
- incorporación microorganismos propios de carpóforos y ectomicorrizas de la especie

Se seleccionarán 4 plantaciones truferas mayores de 9 años: 2 que se encuentren en plena producción, una que posea ectomicorrizas de trufa negra pero que no haya empezado a producir y otra no productora que además haya perdido las micorrizas. El Equipo Investigador ya se ha puesto en contacto con algunos miembros de la Asociación de Truficultores de Teruel (ATRUTER) para asegurar la posibilidad de trabajar sobre sus parcelas (ver cartas adjuntas). Sin embargo se dedicarán las primeras semanas de trabajo del proyecto en terminar con la selección de las parcelas

y en comprobar la micorrización de los árboles sobre los que se trabajará a lo largo de los tres años. Para la realización de este análisis preliminar se empleará un método generado recientemente (SÁNCHEZ, 2012) obtenida con el proyecto INIA-PET 2007-13-C07.

Se seleccionarán 30 encinas en cada plantación, a ser posible que nunca se hayan practicado pozos sobre ellas.
A esos árboles se les practicarán 6 perforaciones de unos 30 cm de diámetro y 30 de profundidad con una barrena motorizada. En dos se reincorporará la tierra extraída, en otros dos se mezclará con uno de los sustratos (2 litros por pozo) que parecen tener mayor efectividad, realizado a base de restos vegetales compostados, y en otros dos se mezclará con ese mismo sustrato pero incorporando además una mezcla de microorganismos. Todos los pozos se marcarán debidamente y se taparán con piedras de las propias plantaciones. Como testigo se colocarán además dos montones de piedras en cada árbol. Estos tratamientos están pareados porque a uno de cada pareja se le incorporará polvo de trufa a razón de 30 millones de esporas por pozo (equivalente más o menos a 3 gramos).

Los microorganismos se inocularán por riego de una suspensión de propágulos. Parte de las tareas de un proyecto de investigación en el que se encuentra trabajando este equipo investigador en colaboración con el equipo del Prof. Domingo Blanco de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza es la obtención de estos microorganismos, la cual estará finalizada con anterioridad a la realización de los tratamientos. Ya se dispone de una colección de bacterias propias de carpóforos de *T. melanosporum* (*Pseudomonas* spp. principalmente) pero en el tiempo que resta se pretende identificar algún microorganismo más que esté significativamente más presente en la rizosfera de ectomicorrizas de trufa negra de árboles productores. Tanto esta parte del trabajo, como la preparación de los tratamientos a base de microorganismos, incluyendo también analíticas anuales para comprobar la persistencia de los mismos en los suelos tratados, se subcontratarán al equipo del Dr. Blanco.

Todos los tratamientos se realizarán durante la primavera del primer año de proyecto (2014).

Durante todas las campañas truferas (del 15 de noviembre al 15 de marzo) que abarque el desarrollo del Proyecto que se solicita, se acompañará a los propietarios de las plantaciones a recolectar las trufas en las mismas y hacer así la toma de datos. En principio la frecuencia de recolección es semanal, por lo que un día a la semana podría hacerse la toma de datos en una de las 4 parcelas. Debe indicarse que no es habitual que los recolectores permitan la obtención de esta información sobre sus propias cosechas. La buena relación entre el equipo investigador y las diferentes asociaciones de productores de trufa de Aragón permiten la posibilidad de plantear este tipo de trabajos.

Los datos a tomar, para cada carpóforo que fructifique en esos árboles, serán: peso, forma, calidad (mediante un método no destructivo) y dónde ha sido localizada (árbol, tratamiento en el "pozo" o fuera de los "pozos"). El método para medir la calidad *in situ* se pondrá a punto durante el primer año, caracterizando trufas de diferentes estados de madurez con un densitómetro portátil que determina la densidad de los frutos mediante la transmisión de ondas por pequeños golpeos, el cual se empleará en la toma de datos en campo.

Los efectos de la práctica de "pozos" suelen comprobarse dos campañas después de su realización, en nuestro caso la campaña 2015-2016. Debe tenerse en cuenta que las raíces deben recolonizar el espacio del "pozo". Sin embargo se espera obtener algún dato en la campaña 2014-2015. Durante la primera campaña, dada la novedad de este tipo de toma de datos *in situ*, se acompañará durante la recolección a los truficultores poniendo en práctica la metodología.

Se realizarán modelos de regresión (programa IBM SPSS v.15) para evaluar la influencia de las variables de diseño (tratamiento aplicado a los pozos) sobre las variables dependientes (producción, peso por carpóforo, calidad, etc.).

Objetivo 2.- Conocer la relación entre la cantidad de estructuras vegetativas de trufa negra: micelio extraradical (análisis de ácidos nucleicos) y ectomicorrizas y la producción de carpóforos.

De las dos parcelas productoras se seleccionará la que posea un mayor rendimiento y en ella se trabajará sobre otros 14 árboles más. Se practicarán 6 pozos a cada uno de ellos, que se rellenarán con el tratamiento que parece, *a priori*, tener más posibilidades de incrementar la producción trufera y que además, es el más usado por el sector: la mezcla con sustrato. No se incorporará trufa para no influir en los análisis de ADN. Desde marzo de 2015 a marzo de 2016, se pretende tomar 6 muestras en los pozos y 6 fuera de ellos cada mes, con una barrena de 4 cm de diámetro por 30 de altura.

Se destinarán a recuentos de ectomicorrizas y a cuantificación de micelio extraradical por análisis de ácidos nucléicos por PCR a tiempo real. Para este último aspecto se emplearán los métodos desarrollados por PARLADÉ et al. (2012) para la realización de las extracciones a partir de muestras de suelo y de SÁNCHEZ (2012) para hacer las cuantificaciones. El equipo de PCR a tiempo real que se empleará se encuentra en el Centro de Investigación y Experimentación en Truficultura que la Diputación Provincial de Huesca posee en Graus.

Se evaluarán las diferencias entre la concentración de ADN y de ectomicorrizas en los pozos y fuera de ellos a lo largo de un año mediante ANOVA de medidas repetidas.

Además se pretende cuantificar expresión génica sexual según el método ZAMPIERI et al. (2012) empleando también el equipo de tiempo real.

Todas estas técnicas se pondrán a punto con material similar al explicado en este proyecto en explotaciones truferas que ya empleen esta metodología de pozos de forma habitual.

Objetivo 3.- Establecer una escala temporal de sucesos en la zona de suelo cercana a la fructificación que incluya: aparición de primordios y presencia de artrópodos relacionados con la dispersión de la trufa y dinámica poblacional de las comunidades fúngicas asociadas.

De nuevo se emplearán 6 árboles diferentes con 6 pozos cada uno, del modo detallado en el punto anterior y únicamente en la parcela más productora, entre los que se pretende levantar por completo dos pozos cada mes (marzo de 2015 a marzo de 2016) para localizar empleando el microscopio estereoscópico la presencia de primordios de trufa, o cualquier otra estructura como pupas de insectos como *Leiodes cinnamomea* o *Helomyza tuberivora*. En el caso de los insectos se determinará el estadio de desarrollo larval en el que se encuentran estas plagas. Para realizar el estudio de las comunidades fúngicas que comparten hábitat con la trufa negra en la zona de suelo cercana a la fructificación se utilizarán herramientas moleculares DGGE (electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante). Amann et al. 1995; Von Witzingerode et al. 1997). Esta técnica permite estudiar las variaciones de las poblaciones dominantes de microorganismos presentes en una muestra (ya sea suelo o material vegetal) a lo largo del tiempo (Muyzer y col., 1993, Muyzer y Smalla 1998). Esta técnica permite analizar gran cantidad de muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo durante un largo período de tiempo.

La técnica implica la extracción de ADN, amplificación mediante PCR con cebadores específicos de hongos y visualización de los productos de PCR en geles de poliacrilamida en gradiente desnaturalizante (DGGE) teñidos con bromuro de etidio. Los patrones resultantes nos mostraran la

diversidad de la comunidad fúngica del suelo. Para ello se extraerá el ADN total desde las muestras de suelo recogidas en este objetivo empleando el kit FastDNA Spin Kit for Soil (QBioGene, MP Biomedicals LLC, OH, USA) tal y como se describe en Larena y Melgarejo (2009). Las ADNs extraídos se emplearán como molde para 2 tipos de Nested-PCR (Vázquez 2014), con cebadores específicos para los genes del 18S RNA ribosómicos de hongos:

1. NSO/EF3 (1ª ronda de PCR) y NS1/FR1GC (2ª ronda de PCR).
2. EF4/EF3 (1ª ronda de PCR) y EF4/NS3GC (2ª ronda de PCR).

Los productos de amplificación posteriormente se analizaran mediante DGGE en un Equipo DCode Universal Mutation Detection System (BioRad) en las condiciones puestas a punto en nuestro laboratorio (Vázquez 2014). Se utilizaran geles de poliacrilamida al 6% (p/v) en tampón TAE 1x con un gradiente desnaturalizante de urea-formamida de 20-60%, a 60ºC y 200 V durante 2 horas y 30 minutos.

Los patrones resultantes serán comparados realizando un análisis de segregación mediante el Método de agrupación jerárquica (UPGMA, "unweighted pair-group method") (Sneath y Sokal, 1973) a partir de las matrices de similitud obtenidas utilizando el coeficiente Jaccard. Además, se secuenciarán las bandas más importantes que nos darán idea acerca de los organismos específicos presentes en esa comunidad

Plan de trabajo

Cronograma de las actividades / tareas del subproyecto

ACTIVIDADES / TAREAS	PERSONAL	1ER AÑO PROYECTO				2O AÑO PROYECTO				3ER AÑO PROYECTO			
		1er TRI	2o TRI	3er TRI	4o TRI	1er TRI	2o TRI	3er TRI	4o TRI	1er TRI	2o TRI	3er TRI	4o TRI
Selección de parcelas y árboles	EI	x											
Preparación de sustrato e inóculos	IC AC	x	x										
Aplicación de tratamientos	IC AC			x									
Revisión bibliográfica	EI	x	x	x	x	x	x	x	x				
Puesta punto técnicas (toma de datos de producción *in situ*)	EI	x	x										
Puesta punto técnicas (Extracción de ácidos nucleicos de suelo y Cuantificación por PCR a tiempo real)	SS MM IC JB	x	x	x	x	x	x						
Toma de datos de producción *in situ*	IC AC					x	x			x	x		
Toma de cilindros para análisis de AN y micorrizas	MM IC							x	x	x	x		
Análisis de AN y micorrizas	SS MM IC JB							x	x	x	x	x	
Análisis de microbiota fúngica edáfica (DGGE)	IL JB												
Extracción de pozos completos para búsqueda de primordios, artrópodos y microbiota fúngica	MM IC IL							x	x	x	x		
Análisis de los pozos	MM IC JB IL							x	x	x	x	x	
Análisis de datos y redacción de publicaciones	EI										x	x	x
Reuniones con sector trufícola	EI												x
Informe anual	EI				x				x				
Informe final	EI											x	x

SS: Sergio Sánchez; MM: María Martín; IL: Inmaculada Larena JB: Juan Barriuso; IC: Investigador Contratado; AC: Auxiliar de campo Contratado; EI: Equipo Investigador

Bibliografía

ÁGUEDA HERNÁNDEZ, B. FERNÁNDEZ TOIRÁN, M. DE MIGUEL VELASCO, A.M. 2001 Ectomicorrizas presentes en la plantación trufera "Los Quejigares" (Soria). III Congreso Forestal Español VOL. 2: 100-106

ÁGUEDA, B. FERNÁNDEZ, M. DE MIGUEL, A.M. DE ROMÁN, M. 2003 Ectomicorrizas presentes en los encinares truferos del noreste de Soria. I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada , Soria, Mayo 2003

AMANN, RI, LUDWINGG, W, SCHLEIFER, KF. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59, 143-169.

BENCIVENGA, M., GRANETTI B. 1988. Risultati producttivi di tartufaie coltivate di *Tuber melanosporum* Vitt. in Umbria. 2º Congrès International sur la truffe, Spoleto, Italia: 313-322.

BONET J. A., FISCHER C. R., 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.

CARTIÉ G., PALAZÓN C., BARRIUSO J., DELGADO I. 1996a. Un nuevo método de inoculación de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt., Montes, 46, 40-43.

CARTIÉ G., PALAZÓN C., DELGADO I., BARRIUSO J., 1996b. Influencia de los substratos y geles utilizados en la micorrización de *Q. ilex* por *Tuber melanosporum* Vitt. Información Técnica Económica Agraria, 92 V(2), 64-69.

CHEVALIER, G., POITOU N. 1988. Facteurs conditionnant l'utilisation optimale des plants mycorhizes artificiellement par la truffe. 2º Congrès International sur la truffe, Spoleto, Italia: 409-413.

COLI R., COLI A. M., GRANETTI B., DAMIANI P., 1988. Composizione chimica e valore nutritivo del tartufo nero (*Tuber melanosporum* Vitt.) e del tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) raccolti in Umbria. 2º Congrès International sur la truffe, Spoleto, Italia: 511-516.

DE MIGUEL A. 2002. -Estudios en campo de micorrizas: Plantaciones truferas. XII Jornadas sobre los hongos y el bosque. Soria, 22 de octubre de 2002

DE MIGUEL, A. M, DE ROMÁN, M. 2001.-Mycorrhizal fungy compiting with *Tuber melanosporum* Vitt. in cultivated truffle-beds in NE Spain Proceedings of the 3º Internactional meeting on Edible Mycorrhizal Moushrooms. New-Zeland, Julio 2001. CD.

DE MIGUEL, A. M. y SÁEZ, R. 1997b. Análisis de micorrizas en truferas cultivadas de Navarra (España) Publicaciones de Biología de la Universidad de Navarra, Serie Botánica, 10: 11-18.. Pamplona

DE MIGUEL, A.M. y SÁEZ, R. 1998. Ectomycorrhizae identified in a cultivated truffle bed from Navarra-Spain.ICOM 2, International Conference on Mycorrhiza. Uppsala (Suecia)

DE MIGUEL, A.M.; SÁEZ, R. Y DE ROMÁN M., 2003b. Seguimiento de plantaciones truferas de Navarra. Estudios en campo de micorrizas. I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada. Soria, mayo 2003

DE ROMÁN, M. 2003. Las ectomicorrizas de *Quercus ilex* subsp *ballota* y su dinámica post-incendio en una zona potencialmente trufera. Tesis doctoral (inédita). Departamento de botánica, Universidad de Navarra, 488 pp.

DIEZ, J. & MANJON, J. L. 1997. Microsatellite-primed PCR en cuatro *Tuber* spp. asiáticas (Tuberaceae, Ascomycotina) comercializadas en Europa, y sus relaciones genéticas con Tuber spp. europeas. XII Simposio de Botánica Criptogámica. Libro de Resúmenes. Valencia 1997. pp 173-174.

DOMINGUEZ, J.A., MARTIN, A., ANRIQUEZ, A., ALBANESI, A., 2012. The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Tuber melanosporum* on the quality of *Pinus halepensis* seedlings. Mycorrhiza. 22: 429-436.

ETAYO M.L., PALAZÓN C., BARRIUSO J., DELGADO I. 2003. Seguimiento de la micorrización en varias truferas cultivadas de Aragón. Catálogo de micorrizas competidoras. I Congreso Nacional de Micología Forestal Aplicada. Soria. Mayo de 2003.

ETAYO, M.L. 2001. Seguimiento del estado de micorrización de una parcela de cultivo de trufa negra. Valoración del simbionte arbóreo y efecto del tratamiento de acolchado. Estudio preliminar de las micorrizas de un área trufera colindante. Tesis Doctoral (inédita), Universidad de Navarra. 361 pp.

FISCHER, C. y COLINAS, C. 1996. Methodology for certification of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum* for commercial application. In "Proceedings of the 1st International Conference in Mycorrhizae". Berkeley. California. EEUU.

FREY-KLETT, P., GARBAYE, J. y TARKKA, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 176: 22-36.

LARENA, I., MELGAREJO, P., 2009. Development of a method for the detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* strain 212 by combining PCR and a selective medium. Plant Disease 93: 919-928.

LESSA, E. 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. Systematic Zoology, 39: 242-252

MUYZER, G., DE WAAL, EC., UITTERLINDEN, AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding gro 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 695-700.

MUYZER, G., SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73, 127-141.

PALAZÓN C. 2004. Viveros de producción de planta micorrizada. Técnicas de micorrización. En "Curso sobre la truficultura: fundamentos, técnicas y su desarrollo integral". Ibercaja-Cogullada, Zaragoza, 30 de noviembre a 1 de diciembre.

PALAZÓN C., BARRIUSO J. y DELGADO I. 2005. Comparative assay of mycorrhization with different doses of inoculum from different years. Precocity of symbiosis establishment. IV International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (IWEMM4). Murcia (España). Noviembre de 2005.

PALAZÓN C., BARRIUSO J., DELGADO I. 2004. Producción de plantas micorrizadas con *Tuber melanosporum* Vitt. Actas I Jornades Técniques sobre la Tófona Negra (*Tuber melanosporum*). Ares del Maestre (Castellón).

PALAZÓN C., CARTIÉ G., DELGADO I., BARRIUSO J. 1999a. Estudio de la influencia de 6 factores a 3 niveles, sobre el proceso de micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt., y sobre la mortalidad producida en el mismo. Abstracts V International Congress Science and Cultivation of Truffle. Aix-en-Provence, Francia, 4-6 marzo. 70-71.

PALAZÓN C., CARTIÉ G., DELGADO I., BARRIUSO J. 1999b. 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. Actas V International Congress Science and Cultivation of Truffle, Aix en Provence,311-313.

PALAZÓN C., URDÍROZ A., BARRIUSO J., DELGADO I. 2002. La certificación de la planta micorrizada con trufa negra. Información Técnica Económica Agraria, volumen extra, nº 23 (2002), 72-77.

PALAZÓN, C. BARRIUSO, J. SÁNCHEZ, S. ASENSIO, C. 2007. Influencia de la aportación de cepas de *Pseudomonas* spp. en la micorrización de encina con *Tuber melanosporum* Vitt. Actas de la 1ª Conferencia Mundial sobre conservación y uso sostenible de Hongos Silvestres. Córdoba. p: 214-216.

PALAZÓN, C., BARRIUSO, J. 2007. Viveros y producción de planta micorrizada. En: Truficultura. Fundamentos y técnicas. S. Reyna (Ed.). Mundi prensa. 688 pp.

PALENZOLA, M., BIOCCA E. 1988. "Studi preliminari sulla tipizzazione genetica (sistemi gene-enzima) di specie del genere *Tuber*." 2º Congrès International sur la truffe, Spoleto, Italia: 53-58.

PARLADÉ, J., DE LA VARGA, H., DE MIGUEL, A.M., SÁEZ, R., PERA, J., 2012. Quantification of extrarradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. Mychorrhiza. En prensa.

PIRAZZI, R. 1988. Micorrizazione artificiale con miceli isolati "in vitro" di *Tuber melanosporum* Vitt. e *Tuber magnatum* Pico. 2º Congrès International sur la truffe, Spoleto, Italia.: 173-184.

SÁEZ, R. DE MIGUEL, A. M 1999. - Truficultura en Navarra (España): resultados técnicos y control de la micorrización en campo: Actes du Ve Congrès International Science et culture de la Truffe. Aix- en Provence (Francia) 1999: 8.463-8.465.

SÁNCHEZ S. 2008. Determinación de la flora ectomicorrícica y evaluación del estado de micorrización de 30 plantaciones truferas de las provincias de Huesca y Zaragoza. Trabajo de Investigación. Departamento de Agricultura y Economía Agraria. Inédito, 65 pp.

SÁNCHEZ, S., 2012. Ectomicorrizas en el cultivo de trufa negra: ecología, diversidad y gestión. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. 279pp.

SCHÄFER, H., MUYZER, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. In: Methods in Microbiology (Paul, J.H., Ed.), vol. 30, Academic Press, London

SNEATH, P., SOKAL, R. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company. San Francisco.

SMITH S.E., READ D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Elsevier Ltd. Academic Press. 787 pp.

SUZ L.M., MARTÍN M.P., COLINAS C. 2006. Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil. FEMS Microbiol Lett., 254: 251-257.

VON WINTZINGERODE, F., GÖEBEL, U.B., STACKEBRANDT, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews 21, 213-229.

VAN HANNEN, E., MOOIJ, W., VAN AGTERVELD, M., GONS, H., LAANBROEK, H. 1999. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2478-2484

VÁZQUEZ, G. 2014. Mejora de la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

ZAMPIERI, E., RIZZELLO, R., BONFANTE, P., MELLO, A., 2012. The detection of mating type genes of *Tuber melanosporum* in productive and non productive soils. Applied Soil Ecology. 57: 9-15.