



**Universidad**  
Zaragoza

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRARIAS  
Y DEL MEDIO NATURAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:**

**CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO NATURAL**

**“Efectos de *Rhizoctonia* spp. binucleada  
y *Trichoderma harzianum* Rifai sobre la  
micorriza de *Tuber melanosporum* Vittad.”**

Memoria presentada por:

**Zoila Karina Solis Hidalgo**

para optar al Grado de Doctora por la  
Universidad de Zaragoza

Abril 2017

## RESUMEN

Las trufas son fructificaciones hipogeas comestibles de hongos ectomicorrícicos. De entre todas las trufas, la trufa negra (*Tuber melanosporum*) destaca por sus características organolépticas que la convierten en una auténtica delicia de la gastronomía europea. *T. melanosporum* se asocia en simbiosis ectomicorrícica con el huésped, formando sus hifas una envoltura alrededor de los ápices tróficos radiculares de la planta que infecta. El huésped también es susceptible a diversos patógenos como *Armillaria mellea*. El control de estos patógenos es limitado porque los fungicidas afectarían a *T. melanosporum*. En trabajos previos realizados en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) sobre el cultivo *in vitro* de trufas y ectomicorrizas se aisló sistemáticamente el género *Rhizoctonia* sp., cuyo micelio mostró características similares al descrito para *T. melanosporum*. También se tenía conocimiento de la capacidad antagónica la cepa T50 de *Trichoderma harzianum* frente a hongos competidores de la micorrización. Estos hechos suscitaron interrogantes sobre la relación entre *Rhizoctonia* y *T. melanosporum*, que en esta tesis se han pretendido dilucidar.

A través de la identificación de los hongos filamentosos que cohabitan con las ectomicorrizas, las trufas y los suelos truferos se han identificado, con un micelio muy similar al descrito en los años 70 para *T. melanosporum*, dos aislados ERhIC (*Ceratorhiza* sp.) y sRKE (*Diaporthe* sp.) cohabitando en las ectomicorrizas. Ambos aislados resultaron avirulentos para las encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), con capacidad de crecimiento tanto a pHs ácidos como básicos, mesófilos y compatibles en cultivo dual. Para su seguimiento en las trufas se han desarrollado marcadores moleculares específicos de estos dos aislados. Por otro lado, se ha explorado el uso de 55 aislados de *Trichoderma*, provenientes de suelos aragoneses truferos, trufa y ectomicorrizas de *T. melanosporum*, como antagonistas del patógeno *A. mellea*. La caracterización morfológica y molecular de estos aislados ha permitido identificar 11 especies (*T. tomentosum*, *T. atroviride*, *T. rossicum*, *T. pleuroticola*, *T. virens*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. koningii* y *T. harzianum*) nativas de los suelos calizos aragoneses. De todos ellos, los aislados *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. rossicum* inhibieron el desarrollo *in vitro* de *A. mellea*. Finalmente, se ha valorado el efecto sinérgico de *Diaporthe* sp. sRKE, *Ceratorhiza* sp. ERhIC y *T. harzianum* T50 en la micorrización artificial de *T. melanosporum*. Todas las coinoculaciones superaron el porcentaje de micorrización establecido actualmente (30%) para la certificación de planta micorrizada, llegándose hasta un 70% con la combinación *Diaporthe* sp. sRKE - *T. melanosporum*. A pesar de estos avances, persisten incertidumbres sobre la relación de estos hongos con la producción de trufas.

## SUMMARY

Truffles are edible hypogeous fructifications of ectomycorrhizal fungi. Among all the truffles, black truffle (*Tuber melanosporum*) stands out for its organoleptic characteristics that make it a real delight of the European gastronomy. *T. melanosporum* is associated in ectomycorrhizal symbiosis with the host, its hyphae forming an envelope around the trophic root apices of the plant that it infects. The host is also susceptible to various pathogens such as *Armillaria mellea*. Control of these pathogens is limited because fungicides would affect *T. melanosporum*. In previous works carried out at the Agrifood Research and Technology Centre of Aragon (CITA) over *in vitro* cultivation of truffles and ectomycorrhizae, the genus *Rhizoctonia* sp. was isolated systematically, whose mycelium showed characteristics similar to that described for *T. melanosporum*. The antagonistic capacity of the *Trichoderma harzianum* T50 strain against competing fungi of mycorrhizae was also known. These facts raised questions about the relationship between *Rhizoctonia* and *T. melanosporum*, which in this thesis have been sought to elucidate.

Through the identification of filamentous fungi that cohabit with ectomycorrhizae, truffles and truffle soils, two isolates, ERhiC (*Ceratorhiza* sp.) and sRKE (*Diaporthe* sp.) cohabiting in ectomycorrhiza have been identified with a mycelium very similar to that described in the 1970s for *T. melanosporum*. Both isolates were avirulent for oaks (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), with growth capacity both at acidic and basic pH, mesophilic and compatible in dual culture. Specific molecular markers to these two isolates were developed for monitoring in the trunks. On the other hand, the use of 55 *Trichoderma* isolates from truffle soils from Aragon, truffle and *T. melanosporum* ectomycorrhizae were explored as antagonists of the *A. mellea* pathogen. The morphological and molecular characterization of these isolates allowed identifying 11 species (*T. tomentosum*, *T. atroviride*, *T. rossicum*, *T. pleurotica*, *T. virens*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. viridescens*, *T. koningii* and *T. harzianum*) native to the alkaline soils. Of these, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. atroviride* and *T. rossicum* isolates inhibited the *in vitro* development of *A. mellea*. Finally, the synergistic effect of *Diaporthe* sp. sRKE, *Ceratorhiza* sp. ERhiC and *T. harzianum* T50 in the artificial mycorrhization of *T. melanosporum* was evaluated. All co-inoculations exceeded the percentage of mycorrhization currently established (30%) for mycorrhizal plant certification, reaching up to 70% with the combination *Diaporthe* sp. sRKE-*T. melanosporum*. Despite these advances, uncertainties remain about the relationship of these fungi to the production of truffles.