

GENÉTICA DE LAS POBLACIONES IBÉRICAS DE TRUFA NEGRA (*TUBER MELANOSPORUM*)

Iván GARCÍA-CUNCHILLOS¹
Sergio SÁNCHEZ²
Juan José BARRIUSO^{1,2}
Ernesto PÉREZ-COLLAZOS¹

RESUMEN.— La trufa negra tiene una gran importancia económica y social. En el presente artículo de divulgación científica se muestran, de manera sencilla y breve, los resultados obtenidos en el primer estudio genético conducido sobre poblaciones ibéricas silvestres de *Tuber melanosporum*. Se ha detectado una elevada diversidad genética, que muestra el buen estado de conservación genética, así como una alta estructura genética entre poblaciones y una clara diferenciación entre los núcleos geográficos del noreste y suroeste de la península ibérica, motivadas por la presencia del Sistema Ibérico, que puede estar actuando como barrera genética. Por otra parte, los resultados permiten pensar que la mayoría de las poblaciones meridionales, y algunas del centro y norte, sobrevivieron a las glaciaciones. Este artículo constituye la base de trabajos sobre expresión diferencial de aromas, conservación de la especie y desarrollo de marcas de calidad ligadas a este producto.

ABSTRACT.— The black truffle has a big economic and social relevance. This scientific divulgation paper shows, in a brief and easy way, the results

¹ Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Carretera de Cuarte, s/n. E-22071 HUESCA. igarcun@gmail.com, ernextop@unizar.es

² Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón. Avenida de Montañana, 930. E-50059 ZARAGOZA. ssanchezd@aragon.es, barriuso@unizar.es

of the first genetic population assay conducted over Spanish natural populations of *Tuber melanosporum*. High genetic diversity has been detected, showing a good genetic conservation status of the species. Clear genetic differentiation among populations and between north-east and south-east geographical ranges of the Iberian Peninsula has been detected. This last might be a consequence of the presence of the Sistema Ibérico Mountains, which might be acting as a genetic barrier. On the other hand, our results showed that most of the southern populations, as also some of the center and northern ones, have survived to glacial periods. This study is the basis of forward researches on flavor expression, conservation of the species and development of quality marks related to this product.

KEY WORDS.— Evolutionary history, genetic diversity and structure, ISSR, molecular markers, *Tuber melanosporum*, Iberian Peninsula.

INTRODUCCIÓN

La trufa negra es un hongo cuyo cuerpo fructífero (parte del hongo donde se producen las esporas sexuales) se desarrolla completamente bajo el suelo. El intenso aroma que desprende, así como su característico sabor, hacen de él uno de los manjares más apreciados en la cultura gastronómica. Presenta una morfología globosa, irregular y de tamaño variable. Externamente se encuentra recubierta por una capa (peridio) de color negro y brillante que la protege, e internamente es carnosa, con una coloración purpúreo-negrucza recorrida por numerosas venas blanquecinas (gleba) (REYNA, 2011). Su nombre científico es *Tuber melanosporum* Vittad. La enorme demanda de este producto lo ha convertido en objeto de diversos estudios encaminados a conocer su ciclo biológico, su cultivo y sus características organolépticas, entre otros. Se trata, además, de una especie que necesita vivir en simbiosis con ciertos árboles, de los que los más abundantes en la península ibérica son la encina (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* [Desf.] Samp.), el quejigo (*Quercus faginea* Lam.) y la coscoja (*Quercus coccifera* L.). El resultado visible de su asociación con el árbol hospedador son las micorrizas. Estos órganos son el lugar de intercambio de nutrientes entre ambos *socios*. El árbol ofrecerá ciertos productos derivados de la fotosíntesis y el sustrato adecuado para que el hongo crezca, mientras que el hongo favorecerá la captación de agua y nutrientes por parte del árbol (REYNA, 2011).

El ciclo biológico de este hongo es complicado y no está exento de debate en la comunidad científica y en el sector productor. A modo de resumen,

a partir de una espora, emerge un micelio que va colonizando el suelo hasta encontrar una raíz fina de un árbol con la que asociarse. Una vez establecidas las micorrizas en las raíces del árbol hospedador, y por causas aún desconocidas, se produce la formación de un primordio, como consecuencia de la unión de micelios de dos individuos diferentes y sexualmente compatibles. Este primordio dará lugar a una pequeña trufa que irá creciendo hasta madurar, momento en el que produce su aroma característico; es este un reclamo adaptativo para roedores y jabalíes, quienes las consumen y posteriormente diseminan sus esporas en las heces, comenzando así un nuevo ciclo biológico (REYNA, 2011).

La trufa negra se desarrolla exclusivamente sobre suelos calizos y en climas de tipo mediterráneo con sequía estival, atenuada por fenómenos tormentosos. Así pues, la distribución geográfica de la especie está reducida a escasos países de la cuenca del Mediterráneo. Las poblaciones más extensas se encuentran principalmente en Italia, Francia y España. En este último, ocupa sobre todo las sierras prepirenaicas, el Sistema Ibérico, la cordillera costero-catalana y las cordilleras béticas (en torno a la sierra de Segura) (REYNA, 2011). Sin embargo, debido a su importancia económica y a la posibilidad de establecer plantaciones de árboles previamente micorrizados en vivero, en los últimos años se han realizado numerosas introducciones en diferentes países (MURAT y cols., 2004; RICCIONI y cols., 2008; GARCÍA-CUNCHILLOS y cols., 2014).

La enorme presión de recolección a que se ve sometida esta especie está haciendo disminuir de manera dramática su presencia en nuestros bosques. En cien años ha bajado de 1000 toneladas hasta las 50 (aproximadamente) que se recolectan hoy en día en España. Aunque este descenso está siendo frenado por la producción de trufa cultivada, esta práctica no tiene en cuenta la procedencia del material fúngico introducido, por lo que puede influir seriamente en el estado de conservación de los recursos genéticos silvestres, que son el reservorio de la variabilidad propia de la especie.

La genética de poblaciones es una rama de la biología que estudia la diversidad, la estructura y las características propias de cada individuo que compone una población, desde un punto de vista genético. Permite determinar niveles de diversidad genética (en una población y entre grupos de poblaciones), establecer relaciones entre individuos, estimar el flujo génico

(migración de genes de una población a otra o de una generación a otra), fijar la estructura genética de las poblaciones (manera como se reparte la variabilidad genética entre poblaciones o áreas geográficas), determinar cuáles son las poblaciones o individuos más singulares y, por tanto, diseñar planes de conservación sobre las poblaciones *in situ* o *ex situ* (bancos de genes, toma de esporas para repoblar, entre otros) (PÉREZ-COLLAZOS, 2012). Además, la genética poblacional permite esclarecer procesos evolutivos (naturales o derivados de la acción del ser humano) que hayan podido actuar sobre las poblaciones estudiadas. Con el fin de obtener esta información, se utilizan una serie de herramientas denominadas *marcadores moleculares* (segmento de ADN o proteína cuya herencia genética se puede rastrear), los cuales son capaces de detectar variaciones en las secuencias de ADN (polimorfismos). Para el desarrollo de este trabajo se seleccionaron los *marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), que localizan polimorfismos a lo largo del ADN nuclear (PÉREZ-COLLAZOS, 2012). Estos marcadores demostraron una elevada capacidad de detectar variabilidad genética, eran de rápida aplicación, no excesivamente costosos, y fueron capaces de generar resultados con repetitividad y fiabilidad altas.

A pesar de que las relaciones genéticas entre poblaciones de trufa negra han sido estudiadas en Francia e Italia (MURAT y cols., 2004; RICCIONI y cols., 2008), en España hasta el momento no se había realizado ningún estudio de este tipo; por tanto, esta investigación constituye la primera aproximación al conocimiento de la evolución, la diversidad y la singularidad genéticas y el estado de conservación de las poblaciones ibéricas de *Tuber melanosporum*. Este artículo de difusión pretende dar a conocer los resultados y conclusiones más importantes de nuestra investigación de una manera sencilla. Sin embargo, para el lector que desee profundizar más se recomienda la lectura del artículo de GARCÍA-CUNCHILLOS y cols. publicado en la revista *Mycorrhiza* (2014).

MATERIAL Y MÉTODOS

Poblaciones muestreadas

Se muestrearon un total de 190 individuos (cuerpos fructíferos) de 23 poblaciones silvestres diferentes de trufa negra, abarcando casi todo el rango de distribución de la especie en la península ibérica (fig. 1, tabla 1).

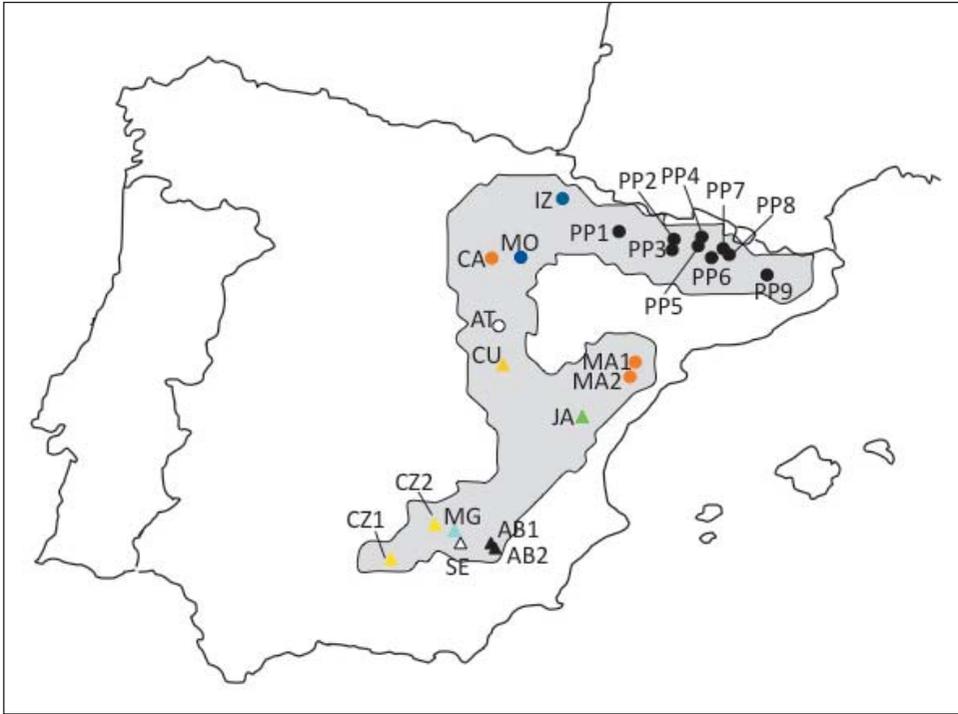


Fig. 1. Localización de las 23 poblaciones de trufa negra muestreadas en el estudio. En gris se muestra el área potencial de presencia de *Tuber melanosporum* en la península ibérica. Véase la tabla I para identificar las localidades correspondientes a cada código.

Una vez recolectado el material, se procedió a ratificar que este se correspondía con la especie *Tuber melanosporum* (identificación macroscópica y microscópica) y a limpiarlo, incluyendo la eliminación de posibles microorganismos que pudieran interferir en el estudio. El cuerpo fructífero se cortó en trozos pequeños, se liofilizó y se conservó a -80°C .

Aplicación de la técnica molecular (ISSR)

Se extrajo el ADN nuclear de los trozos de gleba liofilizados de los diferentes individuos. Posteriormente, se aplicó la técnica molecular ISSR. Esta basa su funcionamiento en la amplificación de secuencias aleatorias del ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores empleados fueron secuencias cortas (di- o trinucleótidos) repetidas

tres o cuatro veces. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa, en la que los diferentes fragmentos de ADN migran del polo negativo al polo positivo, con una velocidad que depende de su tamaño. De esta manera, se obtiene un gel con diferentes bandas comparables entre los distintos individuos. La lectura del gel es simple, se codifica la presencia de una banda como 1 y la ausencia como 0 en cada individuo, obteniendo así una matriz binaria (1-0).

A partir de esta matriz binaria se realizan los análisis estadísticos en diferentes programas diseñados para ello, como se verá a lo largo del apartado siguiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética

La diversidad genética permite conocer la variabilidad existente entre diferentes individuos y agrupaciones de individuos de acuerdo con su rango geográfico o taxonomía. El índice de diversidad genética de Nei es un índice cuyo rango determina la diversidad genética entre los individuos de una población: 0 es la ausencia de diversidad y 1 su máximo. Este índice mostró un nivel moderado de variabilidad genética en las poblaciones ibéricas estudiadas ($h_N = 0,393$, tabla 1). No obstante, dicho valor es superior al detectado en los estudios genéticos de las poblaciones francesas e italianas, lo que corrobora la mayor diversidad genética de las ibéricas y el buen estado de conservación genético en el que se encuentran (MURAT y cols., 2004; RICCIONI y cols., 2008; GARCÍA-CUNCHILLOS y cols., 2014).

Los índices de diversidad estudiados muestran que las áreas geográficas con mayor diversidad genética son las sierras meridionales de Cuenca, Jaén, Murcia, Albacete y Castellón (tabla 1). No obstante, otras poblaciones centrales y septentrionales presentan niveles de diversidad altos; entre ellas, sobresalen las de la sierra de Loarre (PP1), Graus 2 (PP3), Osona (PP9) y Moncayo (MO). Las de Lérida ofrecieron una diversidad genética inferior a la media del resto de las poblaciones. Por otra parte, las de las sierras de Cazorla y de Mágina, en Jaén, y la sierra de Izco, en Navarra, mostraron fragmentos exclusivos, lo que indica la singularidad genética de esas poblaciones (tabla 1).

Por todo lo anterior, los planes de conservación de la especie deberían incluir un banco de germoplasma en el que se cuente con muestras de las poblaciones más diversas genéticamente (PP1, CU, CZ1, MA2, PP9, PP3 y AB2), así como de la población singular de Navarra (IZ). Por otra parte, se debería prestar especial atención a la fragmentación de bosques, que afecta en algunos casos a las poblaciones naturales de *Tuber melanosporum*.

Tabla 1. Localización y diversidad genética de las poblaciones estudiadas de *Tuber melanosporum*.

Provincia	Localización	Código	N	h_N	f_e	f_d
Huesca	Sierra de Loarre	PP1	4	0,797	0	0
Huesca	Graus 1	PP2	9	0,285	0	0
Huesca	Graus 2	PP3	10	0,326	0	0
Lérida	Sierra de Comillini	PP4	2	0,203	0	0
Lérida	Sierra de San Gervasio	PP5	8	0,250	0	0
Lérida	Sierra de Carreu	PP6	7	0,297	0	0
Lérida	Alt Urgell 1	PP7	12	0,266	0	0
Lérida	Alt Urgell 2	PP8	2	0,272	0	0
Barcelona	Osona	PP9	7	0,353	0	0
Navarra	Sierra de Izco	IZ	14	0,281	1	1
Soria	Sierra de Cabrejas	CA	12	0,296	0	0
Soria	Sierra del Moncayo	MO	7	0,301	0	0
Castellón	Sierra de Matarraña 1	MA1	7	0,324	0	0
Castellón	Sierra de Matarraña 2	MA2	9	0,354	0	0
Castellón	Sierra de Javalambre	JA	6	0,379	0	0
Guadalajara	Alto Tajo	AT	11	0,292	0	0
Cuenca	Serranía de Cuenca	CU	6	0,668	0	0
Albacete	Sierra de Segura	SE	6	0,326	0	0
Jaén	Sierra de Cazorla 1	CZ1	8	0,347	1	0
Jaén	Sierra de Cazorla 2	CZ2	10	0,340	1	0
Jaén	Sierra de Mágina	MG	13	0,293	1	0
Murcia	Sierras de los Álamos y del Buitre 1	AB1	10	0,306	0	0
Murcia	Sierras de los Álamos y del Buitre 2	AB2	11	0,312	0	0
		Total	190	0,393	—	—

N = número de individuos, h_N = índice de diversidad genética de Nei, f_e = fragmentos exclusivos, f_d = fragmentos diagnósticos.

Estructura genética

La estructura genética permite conocer la manera como se encuentra distribuida la diversidad genética entre las poblaciones que componen una especie determinada. Se puede estimar a través de varias metodologías, como el análisis de varianza molecular (AMOVA) o algoritmos matemáticos bayesianos que permiten una mayor resolución. Un programa estadístico que facilita realizar estos análisis es el STRUCTURE. Los resultados mostraron que las poblaciones ibéricas presentan una elevada estructura genética (el 47,89% de la variabilidad se debe a diferencias entre poblaciones), lo que indica un cierto aislamiento genético y confirma su singularidad genética. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos en poblaciones francesas e italianas (MURAT y cols., 2004; RICCIONI y cols., 2008), donde la estructura genética no es tan pronunciada como en el caso de las ibéricas, lo que indicaría un mayor flujo génico entre aquellas y, por tanto, una menor singularidad, o posiblemente un origen más reciente que el de las poblaciones ibéricas.

Los resultados bayesianos de estructura genética muestran una clara separación entre las poblaciones del noreste (NE) y sureste (SE) de la península ibérica (fig. 2). Esta diferenciación genética puede deberse a la presencia de una gran barrera física como es el Sistema Ibérico. A su vez, las poblaciones del noreste se subestructuran en dos grupos: NE1, que abarca las de Navarra, Soria, Guadalajara y Matarraña, y NE2, que incluye las poblaciones prepirenaicas de Barcelona, Lérida y Huesca (fig. 2). Hilando más fino, la estructura genética de cada uno de estos dos grupos se puede subdividir tal como lo indican las figuras 2a y 2b, donde cada color indica una estructura genética diferenciada de las demás, por tanto, mostrando la singularidad genética de las poblaciones de la sierra de Izco (IZ) y del alto Tajo (AT), así como la diferenciación entre las poblaciones de Soria y de la sierra de Matarraña (fig. 2a), y la estructuración entre Lérida y Huesca (fig. 2b).

Dentro del grupo sureste, se distinguen igualmente dos subgrupos: SE1, integrado por las poblaciones de las sierras de Cazorla y de Mágina, y SE2, conformado por las poblaciones de las sierras de los Álamos y del Buitre, Segura, Javalambre y Cuenca (fig. 2). El programa STRUCTURE fue capaz de detectar una subestructuración genética en este último grupo, que mostraba la diferenciación genética de las poblaciones de Murcia (sierras de los Álamos y del Buitre, fig. 2c).

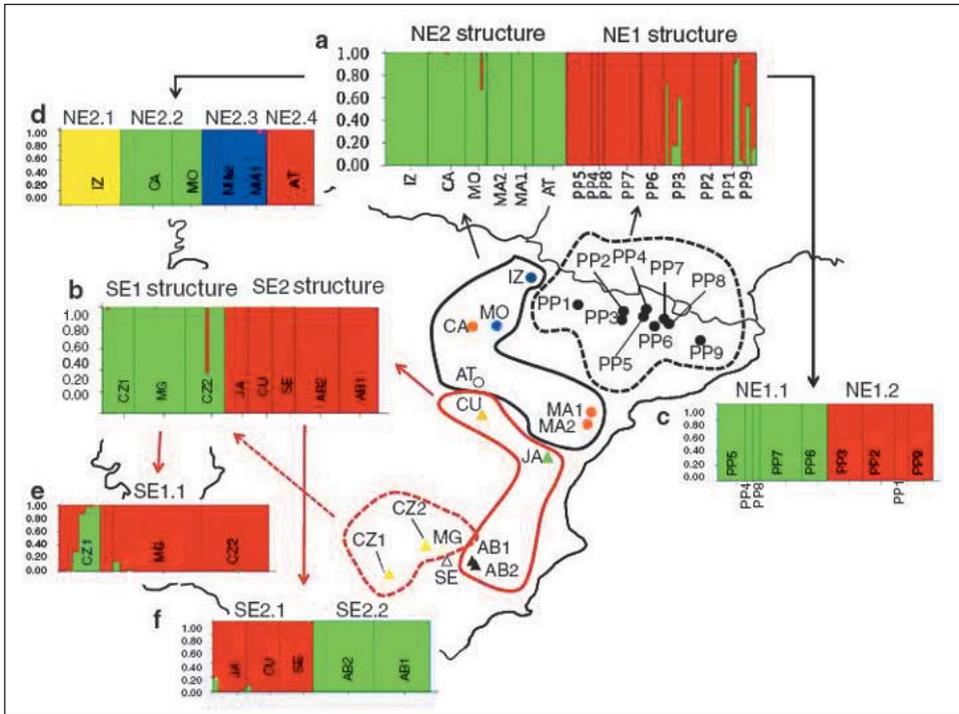


Fig. 2. Estructura genética de las poblaciones de *Tuber melanosporum*. El programa STRUCTURE detecta dos estructuras genéticas en la península ibérica: NE (en negro) y SE (en rojo). A su vez infiere dos subestructuras en el NE (PP1-PP9 y AT, MA1-2, CA, MO, IZ) y dos en el SE (JA, CU, SE, AB1-2 y CZ1-2, MG). La figura a muestra la subestructura del grupo NE1 (AT, MA1-2, CA, MO, IZ), la figura b muestra la subestructura del grupo NE2 (PP1-9) y la figura c muestra la subestructura del grupo SE1 (JA, CU, SE, AB1-2). Las poblaciones se indican en el eje de las abscisas y la proporción de pertenencia a cada grupo en el eje de las ordenadas. Véase la tabla 1 para identificar las localidades correspondientes a cada código.

Relaciones genéticas entre individuos y poblaciones

Con el fin de conocer las relaciones genéticas entre individuos, se estimaron las distancias genéticas entre ellos y se visualizaron mediante la construcción de un árbol *neighbour-joining* (fig. 3). Dicho análisis muestra una agrupación de individuos de una misma población, lo que indica la alta relación genética existente entre ellos. Por otra parte, se aprecia claramente la separación entre las poblaciones del noreste y el sureste de la península ibérica, lo que concuerda con la elevada estructura genética

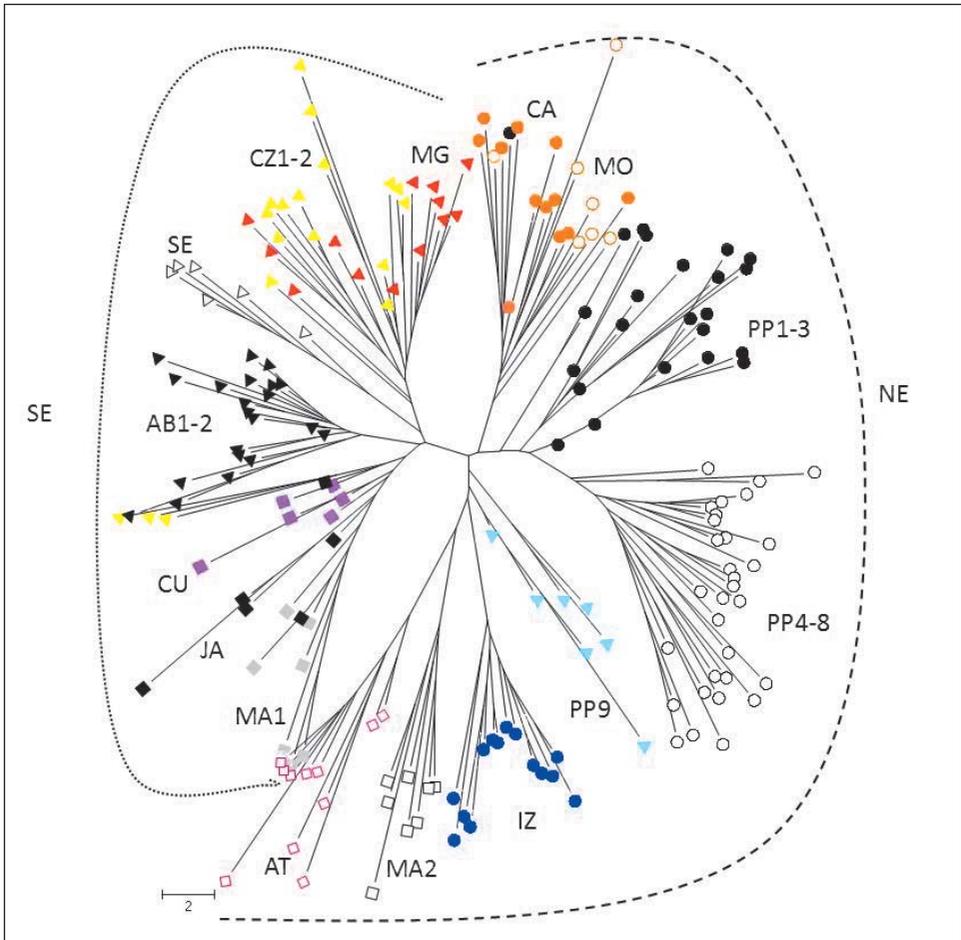


Fig. 3. Árbol *neighbour-joining* que muestra la elevada estructura genética entre los diferentes individuos de *Tuber melanosporum* y su relación genética en la península ibérica. Véase la tabla 1 para identificar las localidades correspondientes a cada código.

encontrada (fig. 2) y los bajos niveles de flujo génico detectados (resultados no mostrados).

Historia evolutiva

La actual distribución geográfica de *Tuber melanosporum* ha sido descrita como consecuencia de un proceso de cuello de botella durante la última

glaciación, hace aproximadamente unos 10 000 – 16 000 años. En este proceso, las poblaciones de trufa negra se habrían reducido a las zonas más meridionales de Europa (especialmente España e Italia). Tras este declive poblacional y el subsiguiente inicio de un periodo interglaciar, se produciría una rápida expansión de la especie hacia el norte. Esta teoría se basa en encontrar poblaciones con mayores niveles de diversidad genética en localizaciones geográficas más meridionales (MURAT y cols., 2004; RICCONI y cols., 2008). Los resultados obtenidos en este estudio muestran, en general, mayores niveles de diversidad genética en poblaciones del sur de España, que corroboran dicha hipótesis (GARCÍA-CUNCHILLOS y cols., 2014). Sin embargo, algunas poblaciones de distribución más septentrional muestran niveles de variabilidad similares o incluso mayores a los de las meridionales. Estos resultados parecen indicar una reminiscencia de algunas poblaciones (Cuenca, Jaén, Murcia, Albacete, sierra de Matarraña 2 y Huesca), que podrían haber actuado como refugios glaciares de la especie para, posteriormente, expandirse hacia otras áreas. Esta expansión no tendría que producirse necesariamente hacia el norte (como hasta ahora se postulaba), sino más bien en función de la existencia de especies arbóreas simbioses y de suelo calizo (requisitos ambos obligatorios para la presencia de la especie).

El hecho de encontrar una alta estructura genética en la mayoría de las poblaciones apoya el largo periodo de tiempo que estas se han mantenido aisladas entre sí y, por tanto, sugiere que la mayor parte de las de la península ibérica han podido mantenerse, ya sea en pequeños reductos vivos o como cuerpos fructíferos congelados en el suelo durante las glaciaciones.

CONCLUSIONES

Recapitulando la información presentada en este artículo, se puede concluir que las poblaciones ibéricas de trufa negra muestran un elevado nivel de diversidad genética, por lo que indican un buen estado de conservación. Por otra parte, se ha detectado una elevada estructura genética entre las poblaciones estudiadas, que separa el total de poblaciones en dos grupos geográficos diferenciados (noreste y sureste de la península ibérica), divididas por el Sistema Ibérico. A su vez, se ha detectado una subestructuración

genética que muestra la singularidad de algunas poblaciones como sierra de Izco (IZ), alto Tajo (AT), Matarraña (MA1-2) y los Álamos y el Buitre (AB1-2); por tanto, con fines de conservación genética dichas poblaciones deben ser consideradas como unidades genéticas diferentes al resto de las poblaciones.

Los resultados concuerdan con una reducción de la distribución de la especie en la última glaciación, a la que habrían sobrevivido posiblemente varias poblaciones (tanto meridionales como septentrionales), expandiéndose posteriormente según la disponibilidad de suelo calizo y especies arbóreas simbioses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Beatriz Águeda, Jordi Bonet, Santiago Estopiñán, Juan Estrada, Vicente Girón, Eloy Martínez, Pere Muxí, Daniel Oliach, Eliseo Palomar y Raimundo Sáez su ayuda en el trabajo de muestreo en campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARCÍA-CUNCHILLOS, I., S. SÁNCHEZ, J. J. BARRIUSO y E. PÉREZ-COLLAZOS (2014). Population genetics of the westernmost distribution of the glaciations-surviving black truffle *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza*, 24: 89-100.
- MURAT, C., J. Díez, P. LUIS, C. DELARUELLE, C. DUPRÉ, G. CHEVALIER, P. BONFANTE y F. MARTÍN (2004). Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial recolonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 164: 401-411.
- PÉREZ-COLLAZOS, E. (2012). *Marcadores moleculares y conservación de especies amenazadas*. Editorial Académica Española. Berlín. 64 pp.
- REYNA, S. (2011). *Truficultura. Fundamentos y técnicas*. Mundi-Prensa. Madrid. 720 pp.
- RICCIONI, C., B. BELFIORI, A. RUBINI, V. PASSERI, S. ARCIONI y F. PAOLOCCI (2008). *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist*, 180: 466-478.