

Hongos hipogeos de la provincia de Lugo: *Tuber foetidum*

Autores: Jose Castro¹, Julián Alonso², Alfonso Vázquez³

^{1, 2, 3} Sociedade Micolóxica Lucus

² Departamento de Producción Vegetal. Escuela Politécnica Superior de Ingeniería (USC)

jose.cogomelos@gmail.com, alonsofungi@galicia.com, corselopalas@gmail.com

RESUMEN

En el presente artículo se expone un estudio macro, microscópico y molecular de la rara especie *Tuber foetidum*, como contribución al todavía escaso conocimiento de los hongos hipogeos de la provincia de Lugo (España).

Palabras clave: *Tuber foetidum*, Ascomycota, hongos hipogeos, Palas de Rei, Lugo.

ABSTRACT

In this paper we share a macroscopic, microscopic and molecular study of the rare species *Tuber foetidum*, as a contribution to the very limited knowledge available on hypogeous fungi in the province of Lugo, Spain.

Keywords: *Tuber foetidum*, Ascomycota, hypogeous fungi, Palas de Rei, Lugo.

INTRODUCCIÓN

Los hongos hipogeos comenzaron a ser estudiados en Italia, principalmente por el gran micólogo italiano Carlo Vittadini (Monticelli, 1800-Milán, 1865) y más tarde se realizaron también estudios en Francia por Louis René Tulasne (Azay-le-Rideau, 1815-Hyères, 1885) y por Lucien Quélet (Montécheroux, 1832-Hérimoncourt, 1899). Se retomaron en Italia por parte de Pier Andrea Saccardo (Volpago del Montello, 1845-Padua, 1920) y a partir de entonces ya su estudio poco a poco se extendió por diversos países donde algunos micólogos se fueron especializando en su estudio. Sin embargo, en Galicia los hongos hipogeos se encuentran todavía muy poco estudiados en general (ALONSO *et al.*, 2015) al no existir en la zona verdaderos especialistas, por lo que cualquier contribución o estudio que sobre este grupo de hongos se realice, resulta de especial importancia para su conocimiento.

El género *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg., al que pertenece la especie objeto del presente estudio, comprende especies de ascomycetes de desarrollo hipogeo, algunas de gran valor económico y que además juegan un importante papel ecológico en los ecosistemas forestales al formar simbiosis micorrícicas con angiospermas y gimnospermas e incluso con orquídeas (OUANPHANIVANH *et al.*, 2008).

Las especies del género *Tuber* se encuentran, en general, ampliamente distribuidas por todo el hemisferio norte y en el caso de *Tuber foetidum* en concreto, su distribución geográfica parece restringirse a la zona comprendida entre los 39º y 62º N (JEANDROZ *et al.*, 2008).

Tuber foetidum es una especie poco citada y estudiada en general, quizás muchas veces confundida con especies próximas.



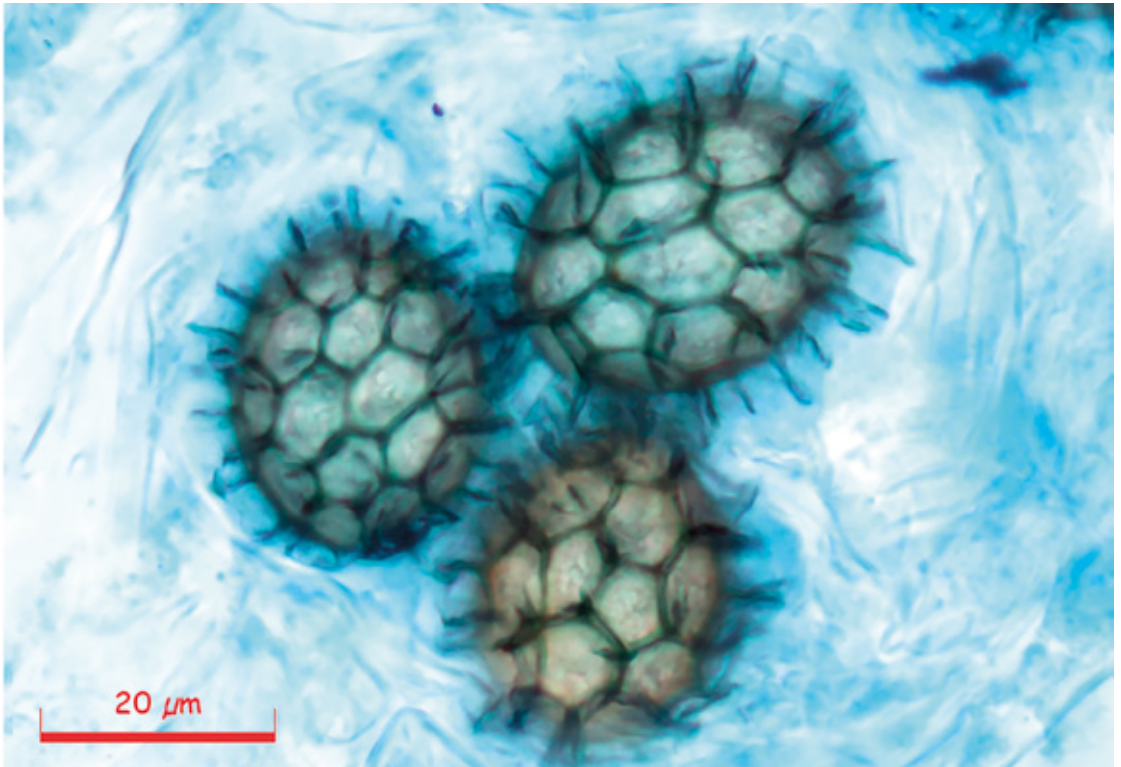
Tuber foetidum Vittad. JCAS0140001000096

*“La revisión sistemática de las hozaduras de jabalí (*Sus scrofa*) en las salidas al campo, permite en ocasiones el descubrimiento de hongos hipogeos que los propios animales dejan al descubierto...”*

MATERIAL Y MÉTODOS

Las coordenadas de la posición y altitud de los ejemplares objeto de estudio se registraron utilizando un aparato GPS Garmin Fenix. Se tomaron diversas fotografías utilizando una cámara réflex digital Nikon D5300, provista de objetivo Nikkor AF-S Micro 60mm f/2.8G ED. También se tomaron fotografías macro adicionales utilizando una cámara compacta Panasonic Lumix DMC-TZ40.

Con la ayuda de una lupa binocular Seben Incognita III de 20-80 aumentos se efectuó un estudio macroscópico complementario. El estudio microscópico se efectuó utilizando los siguientes equipos: un microscopio óptico trinocular Olympus CX41 provisto de objetivos de 4x 10x 40x 60x e 100x (inmersión), así como de oculares 10x y un microscopio óptico trinocular Nikon Eclipse 80i con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x (inmersión). Las fotografías del estudio en los mencionados microscopios ópticos se efectuaron con una cámara Touptek U3CMOS18000KPA y con una cámara Nikon DS-Fi1 con controlador de cámara Nikon DS-U2, y las mediciones de las distintas estructuras microscópicas mediante el software Piximètre v.5.9. Este estudio se realizó sobre material fresco y vivo, según lo indicado por BARAL (1992), utilizando para el mismo agua



Esporas de *Tuber foetidum* al MO. LCB a 1000x

e IKI. Solo de forma puntual se usó en algunas preparaciones azul de algodón de lactofenol.

Este estudio microscópico se complementó, principalmente para la comprobación de la morfología esporal de la especie estudiada, con el uso de un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JEOL JSM 6360LV (instrumental de la Unidad de Microscopía Electrónica y Confocal de la Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo), para lo que se tomó una esporada libre del hongo, previamente secada a 40 °C, que se colocó sobre un portaobjetos de MEB y se metalizó en un Sputter Coater BAL-TEC SCD005 con Au. Las observaciones se realizaron a 20KV, tomándose además diversas imágenes de las mismas.

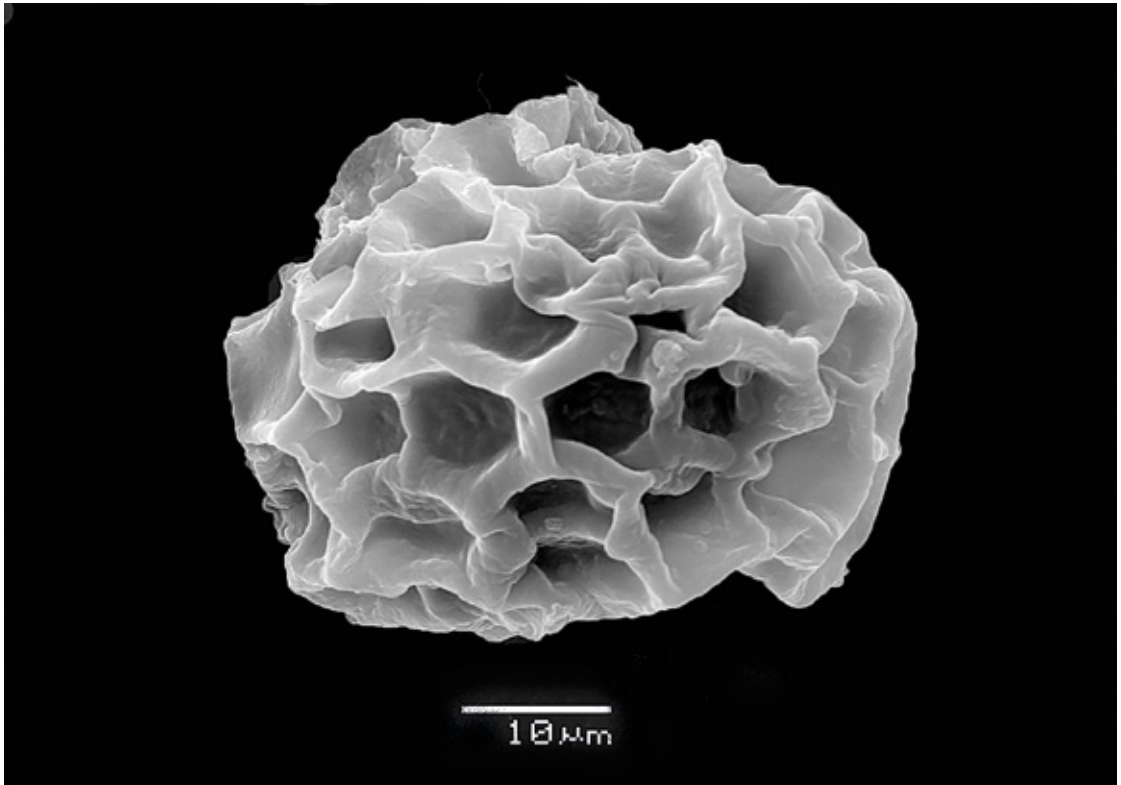
Las mediciones esporales se efectuaron sobre preparaciones de las mismas en agua. La comprobación de la presencia o ausencia de amiloidía se efectuó utilizando IKI.

Se tomó una muestra del suelo sobre la que se analizó su PH, empleando para ello un PH-metro portátil digital Adwa AD-11. El análisis se realizó en una proporción de disolución tierra-agua de 1:5 con compensación automática de temperatura. Los datos de PH obtenidos se incorporaron a este estudio.

Las referencias de los colores citados en este artículo corresponden a las *Munsell Soil-Color Charts* (MUNSELL, 2009).

Un vez finalizados los estudios macro y microscópicos, los ejemplares recogidos como muestras se secaron mediante deshidratador eléctrico a 40 °C, almacenándose como *exsiccata* en los herbarios privados de Jose Castro (JCAS) y Julián Alonso (JAD).

Extracción del ADN, amplificación y secuenciación:
El ADN total se extrajo a partir de muestras secas



Espora de *Tuber foetidum* al MEB

empleando una modificación del protocolo de MURRAY & THOMPSON (1980). Una porción de las muestras se homogeneizó con ayuda de un micropistilo en 600 μ L de *buffer* CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 65 °C. Se añadió un volumen equivalente de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) y se mezcló con la muestra hasta su emulsión. Tras centrifugar la mezcla durante 10 min a 10000 g, el ADN en el sobrenadante se precipitó con un volumen de isopropanol. Tras 15 minutos de centrifugación a la misma velocidad, el *pellet* se lavó en etanol 70% frío, centrifugado de nuevo 2 minutos y secado. Finalmente, se resuspendió en 100-300 μ L de ddH₂O. La amplificación por PCR se efectuó con los *primers* ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990, GARDES & BRUNS, 1993) para la región ITS, y los *primers* LR0R y LR5 (VILGALYS & HESTER, 1990, CUBETA *et al.*, 1991), para la región 28S rDNA. El programa

de amplificación consistió en un *hot start* a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 45, 30 y 45 s a 94 °C, 54 °C y 72 °C, respectivamente, con una fase final de elongación a 72 °C durante 10 min. Los resultados se chequearon en un gel de agarosa al 1%, y las reacciones positivas se purificaron y secuenciaron con el *primer* ITS4. Las secuencias obtenidas se compararon con los cromatogramas originales para detectar y corregir posibles errores de lectura.

Estos procesos fueron realizados en el laboratorio especializado ALVALAB (Oviedo, España).

DESCRIPCIÓN DE ESPECIES

Tuber foetidum Vittad., Monographia Tuberacearum (Milano): 41 (1831)

Clasificación taxonómica: Reino: *Fungi*; Subreino: *Dikarya*; División: *Ascomycota*; Subdivisión:

Pezizomycotina; Clase: *Pezizomycetes*; Subclase: *Pezizomycetidae*; Orden: *Pezizales*; Familia: *Tuberaceae*; Género: *Tuber*; Especie: *Tuber foetidum*.

Diagnosis original:

"Globoso-mammosum, laeve vel minute muricatum, molle. Venae parum numerosae e variis peridii punctis in carnem directae. Sporidia ovalia, granuloso-echinata, granulis praegrandibus, brunneis repleta.

Odor quasi *Asae foetidae*. Fungus magnitudine nucis avellanae, juglandis passim pressum ac lobato-divisum, uti est de Tubere Magnatum. Color fusco-lividus, rufescens; cortex tennis ungui facile pervius, verrucis minutis, mollibus, infirmibus e cortice diffracto formatis, interdum muricatus. Venae nonnullae latiores, e tot rimis vel foveolis externis peridii ortae, in carnem parum anastomosantur, ac cito disparent, alterae vero filiformes, numerosissimae, cunctam Tuberis massam mirifice percurrunt et pingunt. Caro primo albida, inodora, subcompacta, denum mollis, humida, rufo-fusca, graveolens. Sporangia elliptica, mono, di, raro tetraspora. Sporidia matura, ob granulorum protuberantiam, rubi fructus prorsus referunt. Sub exsiccatione summopere contrahitur.

Vulgo *Agliolo* ab odore Allii.

Hieme maturescit et olet, atque interdum Tuberibus aliis immixtum in foro prostat, odore mox distinguibile; sapor oleoso-rancidus; vix esculentum.

AFFIN. *Tuber foetidum* colore et forma Tuberis rufo proximum. Differt carnis mollitie, odore, venarum et sporangiorum forma. Etiam cum Tubere maculato confunditur, cujus caro tamen compacta et veluti lamellosa, nec non odor et maculae superficiei a foetido facile distinguunt."

Caracteres macroscópicos:

Tuber foetidum presenta ascomas de desarrollo hipogeo, de tipo cleistotecio, globosos, subglobosos o irregulares en cuanto a su forma. Los ejemplares estudiados medían entre 13-19 mm x 9-12 mm, siendo su peridio de color ocráceo

pálido con ligeros matices rosados (Mu 2.5YR 8/2), de unos 350 µm de grosor, de superficie finamente escamosa-verrucosa. Gleba de color blanquecino (Mu 7.5YR 9/1) a gris claro (Mu 7.5YR 7/1).

Caracteres microscópicos:

En el estudio microscópico se observan ascas subglobosas o elipsoidales, sésiles, hialinas, de paredes finas, de 1 a 4 esporas, claramente predominando las bispóricas y trispóricas.

Ascosporas elipsoidales, de medidas (30.8) 30.83 - 39 × (26.9) 26.91 - 29.8 µm Q = (1.1) 1.15 - 1.3 en las ascas bispóricas, (24.9) 25 - 28.3 (29.7) × (19.1) 19.9 - 23.6 (25.4) µm Q = 1.2 - 1.3 en las ascas tetraspóricas, con ornamentación consistente en un retículo más o menos regular, compuesto de mallas pentagonales y hexagonales y espinas de 5 a 6 µm de largo en las esporas procedentes de ascas tetraspóricas. **Peridio** formado por una estructura pseudoparenquimatoso, con células más o menos poligonales o redondeadas.

Caracteres organolépticos:

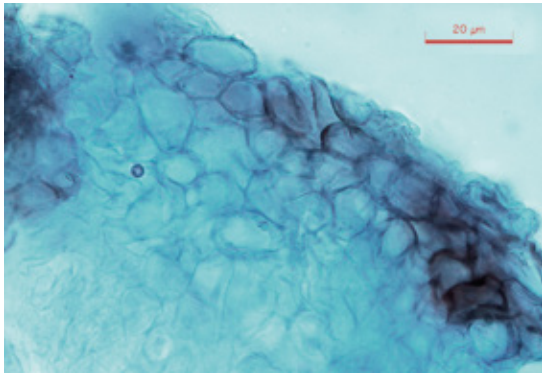
El olor de los ejemplares estudiados es suave, indeterminado y, contrariamente a la mayoría de la bibliografía consultada, no resulta especialmente desagradable a criterio de los autores, coincidiendo en este punto con las apreciaciones de MONTECHI & SARASINI (2000).

Hábitat:

Existen citas de *Tuber foetidum* en muy diversos hábitats: bosque mixto de *Picea abies*, *Betula* sp. y *Pinus sylvestris* (ORCZÁN *et al.*, 2010), *Corylus avellana* (RUBIO *et al.*, 2006), (ANDERBERG & ANDERBERG, 2001), *Fagus* y *Quercus* (JEANDROZ *et al.*, 2008), *Larix* (PEGLER *et al.*, 1993). Los ejemplares estudiados se desarrollaban a unos 10 cm de profundidad en un prado bajo *Pinus radiata* y jóvenes ejemplares aislados de *Salix atrocinerea*. El análisis del suelo en el lugar de aparición arrojó un PH de 6,9, correspondiendo a un suelo neutro.

MATERIAL ESTUDIADO

ESPAÑA: Galicia, Provincia de Lugo, Ayuntamiento de Palas de Rei, Parroquia de San Fiz de Moredo.



Peridio de *Tuber foetidum* al MO. LCB

Altitud: 491 m. PH: 6,9 (suelo neutro). Un pequeño grupo de ejemplares en hozadura de jabalí, en prado bajo *Pinus radiata* y jóvenes ejemplares aislados de *Salix atrocinerea*. 02/12/2017. leg. Alfonso Vázquez, det. Julián Alonso, Alfonso Vázquez et Jose Castro, códigos de herbario: JCAS0140001000096, dupl. JAD17120101. Identificador de secuencia en GenBank: MH703905.

DISCUSIÓN

La revisión sistemática de las hozaduras de jabalí (*Sus scrofa*) en las salidas al campo, permite en ocasiones el descubrimiento de hongos hipogeos que los propios animales dejan al descubierto y que de esta forma pueden ser localizados aún sin la intervención de perros adiestrados. Con esta técnica hemos podido localizar y disponer de los ejemplares estudiados, que en un primer momento, al no presentar un olor especialmente desagradable, no asimilamos a *T. foetidum*, también por el hecho de fructificar bajo *Pinus radiata*, lo que nos sugería una simbiosis con esta conífera pese a la presencia de algún ejemplar de *Salix atrocinerea* en las proximidades, que no consideramos de influencia por tratarse de ejemplares aislados, demasiado jóvenes y no suficientemente cercanos como para pensar en el establecimiento de micorrizas entre ambos. *Pinus radiata* resultaba pues un hábitat, a nuestro criterio, desconocido hasta la fecha para esta especie. El estudio microscópico y posteriormente el análisis molecular nos confirmaron la identificación de *Tuber foetidum*.

Parece confirmarse el amplio registro de hábitats en los que se desarrolla *Tuber foetidum*, a los que habría que añadir *Pinus radiata*. Esta circunstancia nos hace pensar que es posible que *Tuber foetidum* no sólo establezca micorrizas con árboles, sino también con orquídeas, como se sabe que ocurre con otras especies del género *Tuber* (OUANPHANIVANH *et al.*, 2008). La gran similitud (99%) entre la secuencia obtenida en este trabajo respecto a una de las indicadas para *Tuber* sp. (código de GenBank GU327398) en el trabajo de TĚŠITĚLOVÁ *et al.* (2012) en relación a las asociaciones micorrícicas de especies del género *Epipactis* (*Orchidaceae*), parece reforzar esta posibilidad y en ese sentido revisamos, sin éxito, la zona en un intento de localizar posibles especies de orquídeas. Sin duda se requieren estudios complementarios que puedan determinar, en este sentido, cuáles son realmente las asociaciones simbióticas que pueda establecer *Tuber foetidum*.

La comparación, mediante la utilización de la herramienta bioinformática BLAST, de la secuencia del ADN correspondiente a la muestra de los ejemplares aquí estudiados (identificador de secuencia en GenBank: MH703905) con las disponibles en GenBank, mostraron como resultado un grado de similitud de un 99,3 % (coincidencia en 566 de 570 pares de bases) con la secuencia de identificador GenBank FN568055, correspondiente al trabajo sobre esta especie de ORCZÁN *et al.* (2010).

AGRADECIMIENTOS

A Julio Cabero, por la revisión de este artículo y, en general, por su permanente disposición y desinteresada colaboración con los autores en el estudio de los hongos hipogeos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO DÍAZ, J.; CASTRO FERREIRO, J.; VÁZQUEZ FRAGA, A. 2015. Algunas especies de hongos hipogeos localizados en el Parque Natural "Serra da Enciña da Lastra" (Ourense, Galicia, España). *Micolucus* 2, pp. 18-22.
- ANDERBERG, A.A.; ANDERBERG, A.L. 2001. Flora och vegetation i Fasterna socken, *Uppland*. *Daphne* 12, pp. 3–86.
- BARAL, H.-O. 1992. Vital versus herbarium taxonomy: morphological differences between living and dead cells of

ascmycetes, and their taxonomic implications. *Mycotaxon*. 44(2), pp. 333-390.

BLAST [sitio web]. 2018. Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Última consulta: 27-05-2018]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

CUBETA, M.A.; ECHANDI, E.; ABERNETHY, T.; VILGALYS, R. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81, pp. 1395-1400.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, pp. 113-118.

GENBANK [sitio web]. 2018. NIH genetic sequence database. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Última consulta: 28-05-2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

GRYNDLER, M.; ŠMILAUER, P.; ŠT'OVÍČEK, V.; NOVÁKOVÁ, K.; HRŠELOVÁ, H.; JANSKA, J. 2017. Truffle biogeography—A case study revealing ecological niche separation of different *Tuber* species. *Ecology and Evolution*, 7(12), pp. 4275-4288. <http://doi.org/10.1002/ece3.3017>

JEANDROZ, S.; MURAT, C.; WANG, Y.; BONFANTE, P.; LE TACON, F. 2008. Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography*. 35, pp. 815 - 829. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x

MALGORZATA, G.-G.; HILSZCZANSKA, D. 2013. Research on truffles: Scientific journals analysis. *Scientific research and essays*: 8, pp. 1837-1847.

MONTECCHI, A.; SARASINI, M. 2000. *Funghi ipogei d'Europa*. Associazione Micologica Bresadola, Vicenza, Centro Studi Micologici.

MUNSELL, A.H. 2009. Munsell Soil Color Charts. Munsell Color Company, Inc. altimore, Maryland.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19), pp. 4321-4325.

ORCZÁN, K. Á.; TURUNEN, O.; MERÉNYI, Z.; RUDNÓY, S.; BRATEK, Z.; SHAMEKH, S. 2010. "Tuber foetidum found in Finland". *Mycotaxon*. 114, pp. 127-133. doi:10.5248/114.127

OUANPHANIVANH, N.; MERÉNYI, Z.; KUND ORCZÁN, A.; BRATEK, Z.; SZIGETI, Z.; ILLYÉS, Z. 2008. Could orchids indicate truffle habitats? Mycorrhizal association between orchids and truffles. *Acta Biologica Szegediensis* 52, pp. 229-232.

PEGLER, D.N.; SPOONER, B.B., YOUNG, T.W.K. 1993. British truffles. A Revision of British Hypogeous Fungi. Kew, Royal Botanic Gardens.

RUBIO, E.; MIRANDA, M.A.; LINDE, J.; SUAREZ, A.; GARCÍA, F.; JUSTE, P. 2006. Catalogo provisional de hongos hipogeos de Asturias y posibles fotobiontes asociados. *Revista Catalana de Micología* 28, pp. 1-40. ISSN 1135-1225. Disponible en: <http://publicacions.iec.cat/repository/pdf/00000083%255C00000083.pdf>

TĚŠITELOVÁ, T.; TĚŠITEL, J.; JERSÁKOVÁ, J.; ŘÍHOVÁ, G.; SELOSSE, M.-A. 2012. Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany*, 99, pp. 1020-1032. doi:10.3732/ajb.1100503

VILGALYS, R.; HESTER, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172, pp. 4238-4246.

VITTADINI, C., 1831: *Monographia Tubercearum ex Typographia*. Felicis Rusconi, Milano. 88 p.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J.W.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego.