

ASSAIG SOBRE LA TÒFONA NEGRA (*TUBER MELANOSPORUM*) I EL SEU CULTIU

M. FORTUNY

c/ Passarell, 6. 08180 Moià (Barcelona). E-mail: mftuber@hotmail.com

RESUM: Assaig sobre la tòfona negra i el seu cultiu. L' autor explica la importància d'alguns paràmetres que considera fonamentals pel cultiu de la tòfona negra, els que condicionen la seva eficàcia biològica i, per tant, en limiten la fructificació. Es proposa algun índex de mesura de la eficàcia biològica (fitness) i es discuteix alguna hipòtesi sobre la biologia d'aquest fong.

Paraules clau: fitness, plasticitat fenotípica, constriccions, tòfona negra, tubercultura, nínxol ecològic.

RESUMEN: Ensayo sobre la trufa negra y su cultivo. El autor explica la importancia de algunos parámetros que considera fundamentales para el cultivo de la trufa negra, aquellos que condicionan su eficacia biológica y por lo tanto la fructificación. Propone algún índice para medir la fitness y se discute alguna hipótesis de la biología de este hongo.

Palabras clave: fitness, plasticidad fenotípica, constricciones, trufa negra, truficultura, nicho ecológico.

SUMMARY: Essay about the black truffle and its cultivation. The author explains the importance of some parameters that he thinks are key for black truffle cultivation. These determine its fitness, as well as the ascocarp development. The author makes a proposal on the fitness index, and discusses some hypothesis about truffle biology.

Key words: fitness, phenotypic plasticity, constraints, black truffle, truffle culture, ecological niche.

INTRODUCCIÓ

L'aptitud d'una zona per a la producció de tòfones ve determinada per les seves condicions geogràfiques, climàtiques, geològiques, edàfiques i biòtiques. El canvi climàtic modificarà sens dubte la superfície apta per al cultiu (COLINAS *et al.*, 2007). Aquestes condicions delimiten constriccions en l'espai en el qual la tòfona negra és capaç de viure, créixer i reproduir-se. Configurin doncs, la seva àrea de distribució i, essencialment, especifiquen el seu nínxol ecològic, definit com un hiper-volum n-dimensional, dintre del que la tòfona pot mantenir poblacions viables. La producció de tòfones assoliria un òptim per un conjunt concret de factors que puntualitzen el nínxol. Serien els valors de màxima eficàcia biològica o fitness, entesa com una mesura de la capacitat de producció d'espores. S'aporten algunes idees sobre la importància d'alguns dels factors, així com també, sobre la transcendència que pot tenir la fase vegetativa del fong, gràcies a la seva plasticitat fenotípica, entesa com la capacitat per canviar la morfologia i taxa d'activitat davant a inputs ambientals, durant el comportament de la tòfona com a organisme saprotrofic.

L'existència de fenotips haplonts alternatius: hifes, ascòspores, xarxes de miceli, estromes i la seva dinàmica i proporcions pot condicionar l'extensió del cremat (àrea on l'herba creix molt poc o malament, i que revela la presència de la tòfona negra) de les tofoneres i també el desenvolupament dels ascomes. L'autor ofereix la seva visió del procés no determinista de la formació de tofoneres naturals, i en la utilitat del cultiu de la tòfona, que es pot canalitzar mitjançant plantacions d'arbres micorizats i tècniques agronòmiques, com a recurs per reconduir la gran davallada de la producció d'aquest fong per sobreexplotació i males pràctiques de recol·lecció.

INDEX DE FITNESS

Degut a la forma geomètrica de les tòfones podríem valorar la seves fitness, a partir de l'equació al·lomètrica següent:

$$F = 4/3 \times p \times \text{radi}^3$$

volum d'una esfera com mesura del nombre d'espores.

O bé d'una el·lipsoide:

$$F = 4/3 \times p \times a \times b \times c$$

La següent relació i per tofoner donaria una idea del nombre d'espores per pes de tòfones (quotient sense unitats):

$$F \text{ (per tofoner)} = V \text{ (mitjà)} / \text{Quilos totals}$$

En els basidiomicets agaricals una mida de fitness seria $F = p \times r^2$. L'àrea d'un cercle seria una mesura de la superfície del himeni. Per tant, la relació de fitness entre una tòfona idealment esfèrica i un bolet agarical vindria donada per la següent proporció:

$$F \text{ (tòfona)} / F \text{ (xampinyó)} = 4/3 \times r$$

Per tant, si el radi és el mateix, la tòfona produiria $4/3 \times r$ més espores que un basidiomicet agarical. Evidentment les fitness nos son comparables per molts i diferents motius, però sí que és rellevant en el sentit de com la forma i la talla poden determinar el funcionament i l'eficàcia biològica dels fongs. Un cop s'egoten les possibilitats d'incrementar la fitness per increment de la superfície gràcies al replegament de l'himeni, tan sols es pot augmentar la fitness incrementant el volum (un altre dimensió).

LES TÒFONES I ELS SEUS HOSTES

La tòfona negra d'hivern forma part d'un sistema simbiòtic, en el qual el macrosimbiont, a les nostres contrades, sol ser l'alzina el roure, el garric o l'avellaner, encara que pot establir simbiosi amb diverses espècies de coníferes i estepes. Els fongs simbiòtics conreen els organismes que capturen (DAWKINS, 2004). Com bé diu el mateix Dawkins la metàfora és apropiada tant en els cas on l'associació simbiòtica és cooperativa, com en aquells on el fong és més explotador. En la tòfona negra la manifestació del cremat és degut a substàncies produïdes per la tòfona per millorar la interacció amb el seu hoste, el bescanvi de recursos, per evitar o reduir la competència de propàguls de fongs competidors però, fonamentalment, per maximitzar la seva pròpia fitness, obtenir nitrogen i carbohidrats a partir de les plantes no hostes que són danyades i eliminades abans d'iniciar la fase saprofítica.

FACTORS QUE CONFIGUREN EL NÍNIXOL ECOLÒGIC

Els dos factors determinants dels de fongs ectomicorízics que hi ha en una parcel·la són, en primer lloc la comunitat de plantes hostes i, en segon lloc els factors edàfics (DAHLBERG, 2001). Des del punt de vista ecològic podríem assenyalar els següents grups de factors:

- 1- Condicions tèrmiques
- 2- Condicions hídriques
- 3- Factors químics diversos
- 4- Factors mecànics
- 5- Factors biòtics

Per una revisió exhaustiva dels valors dels diferents paràmetres considerats més importants per el cultiu de les tòfones, vegeu COLINAS *et al.* (2007).

CONDICIONS TÈRMiques

La temperatura, sens dubte, és un factor crític. Segons algun autor, la temperatura és un dels components més determinants del nínxol ecològic (HUDSON, 1986). L'amplitud de les temperatures compatibles amb la vida és estret. Des de pocs graus sota zero i fins uns 50°C, com a màxim. La tòfona no és cap excepció. Tant la tòfona com el seu arbre hoste són organismes poiquiloterms i la temperatura ambiental és la que ens dona un punt de referència sobre l'estat tèrmic general d'ambdós organismes (WALTER, 1976). A temperatures per sota de zero graus, l'aigua, el component majoritari de les tòfones, es congela i no es pot donar ni creixement ni maduració. El transport de nutrients en fase líquida típic de les hifes i micelis es col·lapsa i es poden produir danys irreversibles a les hifes. No hi ha doncs activitat vegetativa. La tòfona és un fong hipogeu i aquesta condició el fa més tolerant a las baixes temperatures, sempre que no siguin extremes i no s'allarguin excessivament en la durada. En canvi les temperatures elevades provoquen la desnaturalització de les proteïnes. També en aquest cas la condició de fong hipogeu la fa més sofrerta. La tòfona es un fong mesotèrmic o mesòfil amb un òptim de creixement als voltants dels 20°C.

CONDICIONS HÍDRiques

Tant el protoplasma de les tòfones (hifes, micelis, ascoma), com el de l'arbre hoste només son fisiològicament actius quan estan hidratats. La presència d'aigua és doncs necessària al llarg de tot el cicle vital dels dos simbionts. En general, els fongs són més tolerants que altres organismes a la falta d'aigua i una de les funcions de les micorizes és subministrar aquest recurs a l'arbre (DEACON, 2006). A la bibliografia en relació amb les necessitats d'aigua per al cultiu de la tòfona negra, es donen les dades de precipitació insistint en la importància dels ruixats del mes d'agost. Pel que fa als arbres hostes i, en particular a les alzines son xeròfits esclerofil·les, i que son típics de regions amb un eixut estival prolongat. L'esclerofil·lia es considera una adaptació a regions àrides. En conseqüència alguns autors també es refereixen a la tòfona com a fong xeròfil i adaptat a condicions de sequera. Jo prefereixo el terme de xerotolerant com una forma de reflectir el fet de que la tòfona també és simbiot d'arbres no xeròfils. En aquest sentit, es podria considerar la tòfona com un geòfit fúngic. Ja MALENÇON (1938) va descriure les possibles transformacions morfològiques a partir de Pezizals que conduïen a les Tuberals bàsicament a partir de un replegament de l'himeni i l'adopció d'un hàbitat subterrani. La formació de replecs de l'himeni ha permès incrementar la superfície i augmentar la capacitat de producció d'espores. Finalment la tòfona ha esdevingut esfèrica, esferoïdal o irregularment globulosa. El caràcter hipogeu seria posterior. També el període relativament llarg de maduració i la elaboració d'aromes volàtils per afavorir la dispersió zoocora. Un habitat hipogeu pot en efecte protegir l'esperocarp de canvis ambientals, però, es donarà una millora en l'èxit reproductiu si els mecanismes efectius de dispersió de les espores també evolucionen. Les preuades xapes (tòfones que és formen molt en superfície i es detecten visualment) dels tofonaires furtius (Fig. 1), assenyalen la condició hipogea com una exaptació en el sentit de Gould (GOULD & VRBA, 1982; GOULD, 2004). La novetat evolutiva es va donar com a conseqüència d'un canvi en el patró de desenvolupament d'un fong epigeu (THIERS, 1984). Aquest fet va suposar una alteració gradual i recurrent en l'organització del fenotip sens pèrdua d'adaptació i amb increment de la fitness. En el curs de l'evolució el replegament de l'himeni, l'esfericitat de les tòfones i la producció d'aromes volàtils van permetre el conformar noves adaptacions; la de fong hipogeu i la xerotolerancia.

És més, hi ha autors, com SALLEO & LO GULLO (1990), que consideren que la condició de xeròfit esclerofil·le, en el cas dels arbres hostes, no té un significat ecològic d'estalvi d'aigua, sinó

que l'esclerofil·lia mediterrània procedeix d'estructures anatòmiques que es van desenvolupar en espècies adaptades a ambients més humits i posteriorment, van colonitzar ambients més secs, això concorda amb idees expressades per fitogeògrafs (TERRADAS, 2001). Les tòfones ja devien acompanyar aquestes espècies, i van colonitzar els nous ambients conjuntament.

FACTORS QUÍMICS DIVERSOS I FACTORS MECÀNICS

Aquests factors venen majoritàriament condicionats pel sòl, i poden representar una limitació pel cultiu de tòfones. Per això és aconsellable iniciar una plantació d'arbres micoritzats fent abans una anàlisi del sòl. Tot i així, el terreny destinat a fer una plantació pot ser força heterogeni respecte a molts factors. La falta de producció d'alguns arbres en plantacions pot ser deguda al fenomen de la no uniformitat. Petites variacions en el nínxol poden determinar les condicions necessàries per fructificar. Un aspecte a tenir en compte al fer un seguiment d'una plantació amb tècniques morfològiques i amb sondes d'ADN (PCR), és el fet de que els micelis són molt plàstics. La plasticitat fenotípica entesa com la variabilitat en l'expressió genotípica en resposta a senyals ambientals (BURNETT, 2003) o a la diversitat manifesta del sòl, pot modificar el creixement i l'adaptació en diferents punts d'un mateix miceli i, en conseqüència, l'extensió del miceli en el sòl no ser uniforme (PARLADÉ *et al.*, 2007) i el mostreig per extreure ADN pot resultar complicat. Les estructures reproductores (ascocarp) són molt menys plàstiques (BURNETT, 2003). L'ascoma augmenta per allà on pot fer-ho, amb lo qual la presència de DNA de tòfona en mostres de sòl no implica necessàriament posterior obtenció d'ascomes. En aquest sentit, alts continguts d'argila o de pedres poden suposar constriccions per la collita de tòfones (el desenvolupament del ascoma o no es possible o bé queda truncat) i no ser-ho pel manteniment de les micorizes de la tofona. Els millors sòls serien els francs d'estructura grumollosa. Aquest tipus de conformació es podria considerar com un límit inferior d'un sòl pertorbat mecànicament, remogut. Petites alteracions del sòl poden estimular la fructificació d'algunes espècies de Tuberals, possiblement pel fet que milloren la disponibilitat d'oxigen (LAWRYNOWICZ, 2001), ho perquè oposen menys resistència a una estructura fructífera en fase de creixement. El fet és especialment notable en *Tuber aestivum* (observació personal), en tofoneres silvestres de tòfona negra curosament remoguts (Josep Maria Palomar tofonaire, comunicació personal) i per *Tuber puberulum* (LAWRYNOWICZ, 2001).

Un paràmetre fonamental en el cultiu de tòfones és la relació C/N. Hi ha un canvi en la composició en les espècies en les comunitats fúngiques des dels fongs saprotroífics a fongs micorízics seguint la dinàmica del carboni i del nitrogen, fruit de la descomposició de la matèria orgànica. Quan dominen els saprotrofs, els ràtios C/N decreixen en el temps, possiblement degut al consum del carboni que és utilitzat per la respiració dels saprotrofs i a la retenció de nitrogen en forma de biomassa fúngica. Amb la presència de fongs micorízics, el ràtios C/N s'incrementa en virtut de la mobilització i translocació del nitrogen orgànic cap a les arrels dels arbres simbiotes. Les fonts de carboni utilitzades provindrien dels fotosintetitzats subministrats per l'arbre hoste. Valors de C/N al voltant de 10, serien els més adequats per les plantacions d'arbres micoritzats amb tòfona negra (FORTUNY & ESTRADA, 1986). L'índex C/N seria una mesura de fins a quin punt el carboni i el nitrogen estan espacialment desacoblats. Una possible raó de l'al·lelopatia de les tòfones podria ser l'intent de recuperar el nitrogen i el carboni emmagatzemat a les plantes no hostes necessari per la formació del ascoma. A diferència del miceli, que pot explorar i captar el nitrogen irregularment distribuït, ja que té assegurat el subministrament de sucres per l'arbre, l'ascoma, proveït sols d'unes petites extensions hifals, ha de ser capaç de proveir-se dels dos recursos dins l'entorn immediat. El miceli de les tòfones, al eliminar les plantes no hostes, esmení el nínxol, no altruísticament pel seu hoste, sinó en benefici propi. En aquest sentit es pot pensar amb el que Dawkins anomena el 'fenotip ampliat' (DAWKINS, 1999), fent referència a tot allò on poden influir els gens per millorar l'eficàcia reproductora del seu portador. Podria tractar-se d'un procés de construcció de nínxol (HUTCHINSON, 1965; ODLING-SMEE *et al.*, 2003).

Els fongs estan adaptats per maximitzar la seva pròpia fitness, i han de regular el seu ràtio intern C/N, el qual té efectes morfogènètics importants, tant en els basidiomicets com en els ascomicets (WATKINSON, 1999). El procés de desenvolupament de la tòfona negra, un cop iniciat, serà doncs absolutament dependent de factors i senyals externes, i es molt factible que el miceli detecti un lllindar de C/N, o de N, que sigui un altre component desencadenant de la fase saprofítica.

FACTORS BIÒTICS I CICLE BIOLÒGIC

Les tòfones participen en un continu procés de coevolució, en el qual intervenen per una part la interacció hoste-tòfona (mutualisme simbiòtic), una fase de vida lliure (fase sapròtrofa) i dos processos de mutualisme no simbiòtic lligats als vectors de dispersió tant d'espores com de llavors: rosegadors, altres mamífers, diversos invertebrats, dispersant espores i ocells com el gaig, el tudó i alguns mamífers disseminant les llavors dels arbres hostes. Aquests organismes aporten funcions i serveis als ecosistemes tofoners i representen part de la biodiversitat estructural necessària pel seu funcionament. Avui en dia és força preocupant el factor humà, que intervé en la dinàmica de les tòfones, fent una clara sobreexplotació del recurs. Les demandes del mercat i els guanys a curt termini determinen la pressió sobre tòfones i tofoneres. Les espores no retornen als ecosistemes tofoners explotats. El banc de propàguls de fongs micorízics dels territoris tofoners queda empobrit en espores de tòfones. En conseqüència, es produeix un clar fenomen de dilució. La davallada en la formació de noves tofoneres és preocupant. També ho és la producció de les tofoneres actuals. Una dada: en 20 anys, el nombre de tofoneres al Lluçanès, Osona i Berguedà s'han reduït en un 80%.

El cicle biològic de la tòfona comença amb la descomposició de l'ascoma i alliberament d'espores. Alternativament o simultàniament les espores són dispersades per diversos ens, que es mengen l'ascoma, i les dipositen després amb els excrements. En condicions adequades i en presència d'un hoste adient, les espores germinen i colonitzen les arrels. Hi ha colonitzacions secundàries, per creixement i formació de glomèruls, es formen xarxes tridimensionals que poden ser contínuament remodelades en resposta a senyals ambientals, interacció amb altres fongs i invertebrats micòfags. Es donen cicles anuals de destrucció i reconstrucció de les xarxes, es poden formar estromes. Progressivament, hi ha increment de biomassa fúngica, amb producció de metabòlits secundaris al·lelopàtics, que afecten a les plantes no hostes que acaben essent eliminades.

La descomposició d'aquests vegetals modifica progressivament el nínxol, amb aportacions de nutrients, però especialment compostos de carboni i nitrogen, que afavoreixen una existència de tipus saprotrofic. Finalment hi ha encreuament de tal·lus compatibles (RICCIONI *et al.*, 2008) i posterior fructificació. Els cicles biològics no són senzillament cicles reproductius, ni són fotografies, són processos dinàmics, en els quals hi ha una dimensió temporal important. No es tracta de cicles tancats. Les meïospores produïdes són els ponts que connecten les diferents generacions. La sobreexplotació de les tofoneres estronquen la continuïtat entre generacions i això fa que els efectius de tòfona negra s'acostin al lllindar del col·lapse.

PLASTICITAT EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA TÒFONA NEGRA. MODULARITAT. FENOTIPS ALTERNATIUS.

La simbiosi és pot definir com la convivència íntima de dos o més organismes de diferents espècies, anomenats simbiòntes. Les tòfones formen un tipus especial de simbiosi mutualista anomenada ectomicoriza. Lynn Margulis fa referència a la simbiosi hereditària en la qual els organismes que hi participen estan obligats a mantenir-se junts durant tot el seu cicle biològic, i utilitza el terme de simbiogènesi aplicat al mecanisme evolutiu que explicaria l'aparició de noves espècies, nous teixits i nous òrgans quan la simbiosi esdevé permanent (MARGULIS, 2003 i 2006). L'aparició de la cèl·lula eucariota, segons Margulis, seria un cas de simbiogènesi. El mecanisme de la simbiogènesi implica doncs un procés d'integració de mòduls funcionals. El concepte de modularitat, però, és deu a Needham (NEEDHAM, 1933) i serveix per descriure la

semiindependència i dissociabilitat de processos fisiològics, metabòlics, de diferenciació i de creixement. Els mòduls són subunitats del fenotip determinats per interruptors o punts de decisió que organitzen el desenvolupament (WEST-EBERHARD, 1989 i 1996). Aquest punts de decisió ('switch points') determinen l'habilitat per produir diferents fenotips independents, que són sotmesos a desiguals pressions de selecció. La modularitat contribueix doncs a la plasticitat fenotípica perquè un gran nombre de mòduls poden respondre individualment davant de l'heterogeneïtat ambiental. La versatilitat eco-nutricional d'alguns fongs en seria una conseqüència. Per exemple, els fongs hemibiotròfics del gènere *Taphrina* creixen entre les cèl·lules de fulles de plantes com a paràsits, un cop la fulla esta necrosada viuen com necròfags i, finalment és tornen saprotrofics (COOKE & WHIPPS, 1980). Per *Tuber melanosporum* s'ha suggerit un comportament paràsit de plantes herbàcies (PLATTNER *et al.*, 1995). L'autor també ho ha observat (Fig. 2, desembre 2008): no és forma cap cremat i sols es desenvolupa un ascocarp.

Els fongs són organismes moduls, de creixement repetitiu. En cada miceli individual s'hi poden trobar regions en diferents estadis de desenvolupament (ANDREWS, 1995). La morfogènesi també presenta característiques moduls, ja que diferents processos, anomenats subrutines, es poden reconèixer (al menys, formació del primordi, desenvolupament i maduració) (MOORE, 1998). Les morfologies de bolets teratològics en cultius de basidiomicets saprotrofics comestibles són el resultat del truncament d'algunes de les subrutines, degudes bàsicament a pertorbacions ambientals. El primordi de la tòfona té l'aspecte d'una petita cúpula i és un mínuscul apoteci. És el començament de la fase saprotrofica i no hi ha cap xarxa de miceli que connecti tòfona negra i planta hoste (RICARD, 2003). Segons Ricard el desenvolupament i maduració de la tòfona negra és autònom. Aquest fet és rellevant i contrasta amb els basidiomicets saprotrofics i fongs simbiotes, on el miceli vegetatiu continua creixent per donar suport al desenvolupament de l'esporeocarp. En una tofonera els fenotips alternatius serien: ascòspores, hifes, xarxes de miceli, micorizes, glomèruls i estromes. Els ascomicets es caracteritzen per tenir un cicle biològic haplo-diplode on la fase haploide predomina tant en temps com a l'espai. La diploïdia resta confinada al zigot, i és seguida per una meiosi. Els fenotips alternatius serien diferents opcions (fenotips haplonts) de la fase haploide. En general els fenotips alternatius representen diferents opcions, donada una determinada conformació ambiental, que són funcionalment independents un dels altres; és troben en el mateix estadi del cicle biològic i no són simultàniament expressats per un mateix individu. (WEST-EBERHARD, 1986). A cada tofonera coexistirien els fenotips alternatius en distintes proporcions. Probablement part de la variància fenotípica sigui deguda a variància genètica (FALCONER, 1980).

Els fenotips alternatius poden explicar perquè la quantitat de micorizes no té que estar relacionada necessàriament amb l'obtenció de tòfones. L'absència de correspondència entre la producció de tòfones i l'abundància de micorizes ha estat apuntada (BACIARELLI-FALLINI *et al.*, 2006). Els fenotips alternatius són opcions funcionalment vàlides, en un context determinat del nínxol, per assolir la fase reproductora. El que sí que cal és que hi hagi tal·lus compatibles (RICCIONE *et al.*, 2008). En fase simbiòtica la tòfona ha d'ésser capaç de dur a terme un retorn de serveis al seu hoste, com a moneda de canvi, pels recursos de carbó que n'obté. Les simbiosis micoríziques són, des de el punt de vista evolutiu, inestables, i les relacions filogenètiques entre alguns sapròfits i simbiotes així ho demostren (HIBBETT *et al.*, 2000). Les implicacions semblen evidents: la tòfona ha de ser capaç d'explorar i capturar recursos discontinuament dispersats, tant en l'espai com en el temps. Els micelis són sistemes versàtils de tubs connectats que poden explorar ambients heterogenis, en els quals l'energia es molt variable (RAYNER *et al.*, 1999). Les xarxes són modulades i estructurades continuament en resposta a l'heterogeneïtat del sòl, la dispersió dels recursos i degut a diferents senyals ambientals, tan biòtiques com abiòtiques. Aixó te lloc gràcies al que denominem plasticitat fenotípica, entesa com la variabilitat en l'expressió genotípica en resposta a diferents senyals ambientals (STEARNS, 1989; BURNETT, 2003). La modularitat incrementa la plasticitat fenotípica (RAY, 1990). Gràcies a la plasticitat, els micelis poden disposar d'un ventall de configuracions de xarxes específiques adaptades a diferents necessitats de