

Acta fytotechnica et zootechnica 2  
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2009, s. 32–34

## VPLYV TERMÍNU ZBERU HĽUZOVKY LETNEJ (*TUBER AESTIVUM VITT.*) V PODMIENKACH SLOVENSKA NA ORNAMENTÁCIU SPÓR

### DATE COLLECTION INFLUENCE ON SPORE ORNAMENTATION OF BURGUNDY TRUFFLE (*TUBER AESTIVUM VITT.*) IN SLOVAKIA

Ján GAŽO, Marián MIKO, Peter KRIVOŠ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The aim of our study was to compare spore reticulum height from analyzed truffle carpophores collected during summer (August), autumn (October) and winter (December) and to determine application of microscopic spore analysis for distinguishing of *Tuber aestivum* and *T. uncinatum*. Our measurements confirmed statistically highly significant differences between spore reticulum height from summer against autumn and winter spores. Statistically insignificant difference was found between spore reticulum height from spores analyzed in fruit bodies collected in autumn and winter. High values of coefficient variation for measured data ( $v\% = 22\text{--}29\%$ ) indicate that spore microscopic analysis is applicable only for larger data files. Individual spore measurements manifested high variability even within the same fruit body. Analysis of samples collected in winter revealed presence of morphologically unripe – colourless spores in ascii, what has high importance for optimizing inoculating techniques for production of mycorrhized seedlings and for conservation of truffle genetic resources.

**Key words:** *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, spore, reticulum height

Hľuzovka letná (*Tuber aestivum* Vitt.) je jedlá vreckatá hypogéická huba, ktorá žije v ektomykoríznej symbioze s niektorými druhmi drevín Európskeho mierneho pásma (Olivier et al., 1996). Z hospodárskeho hľadiska patrí medzi vysoko cenené komodity pre svoju špecifickú arómu. Je prirodzene rozšírená v mnohých Európskych krajinách Slovensko nevynímajúc (Gažo, Miko a Chevalier, 2005). Vysoký dopyt po čerstvých plodniacích a obmedzené možnosti zberu na prírodných lokalitách robia z tejto huby zaujímavú pestovateľnú plodinu. Molekulárne analýzy naznačujú vysokú genetickú diverzitu (Gandeboeuf et al., 1997) tohto druhu v porovnaní s príbuzným pestovaným druhom *Tuber melanosporum*, čo dokumentuje aj rozsiahla oblasť rozšírenia a širšie rozpätie vhodných ekologickej podmienok (Chevalier and Grente, 1979). Hľuzovka letná vytvára zrelé plodnice v závislosti od zemepisnej šírky od nejakého jari až do zimy. Vysoko variabilné vlastnosti plodníck ako napríklad farba gléby, tvar peridia, morfológia spór a hlavne intenzita a charakter arómy v období dozrievania viedli viacerých autorov k odlišeniu a popisu dvoch rozdielnych taxonomickej jednotiek *aestivum* a *uncinatum*, v podobe poddruhov (Fischer, 1897), variet (Chevalier and Frochot, 1997), foriem (Montecchi and Sarasini, 2000), morfotypov (Paolocci et al., 2004) či dokonca samostatných druhov (Mello et al., 2002). V súčasnosti je preto mimoriadne dôležité poznať ich taxonomický status z pestovateľského a obchodného hľadiska, ale najmä z hľadiska potreby uchovávania genetickej diverzity. Na základe publikovaných molekulárnych štúdií sú *T. aestivum* a *T. uncinatum* považované za ten istý druh (Henrion et al., 1994; Wedén and Danell 1998). Napriek výsledkom molekulárnych analýz sa z komerčného hľadiska dodnes letné plodnice považujú za *T. aestivum* a jesenné *T. uncinatum*, s rozdielnou cenovou hodnotou. Spóry *T. aestivum* a *T. uncinatum* majú na povrchu retikulárno-alveolárnu ornamentáciu vytvárajúcu nepravidelnú mnohouholníkovú sieťovitú štruktúru (Montecchi and Sarasini, 2000). Niektorí autori naznačujú že výška ornamentácie spór môže slúžiť ako klasifikačný znak pre ich odlišenie (Wedén et

al., 2005). Cieľom práce bolo porovnať výšku ornamentácie spór pochádzajúcich z plodníc získaných v priebehu leta, jesene a zime a na základe výsledkov stanoviť možnosť použitia mikroskopickej analýzy spór pri determinácii *T. aestivum* a *T. uncinatum* v podmienkach Slovenska.

### Materiál a metódy

Plodnice hľuzovky letnej určené na analýzu spór boli zberané na území Slovenskej republiky v súlade s Rozhodnutím Ministerstva životného prostredia SR č. 3800/1184/04-5.1. Dokladový materiál odobratých plodníč je uložený v herbáriu Katedry genetiky a šľachtenia rastlín SPU v Nitre. Pri experimentoch boli použité plodnice *Tuber aestivum* získané v roku 2007 v mesiacoch august v počte osem kusov, október sedem kusov a december šesť kusov z dvoch geografických oblastí – Malé Karpaty a Tribeč. Detailnejšie informácie o lokalitách nie sú uvedené vzhľadom na ich ochranu.

Plodnice boli po zbere a identifikácii uchovávané v mrazničke pri teplote  $-18^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení boli z jednotlivých plodníč odobrané vzorky, ktoré sme homogenizovali v malom množstve destilovanej vody a 96% etanolu. Preparát bol analyzovaný pomocou mikroskopu Nikon TMS-F. Na pozorovaných vzorkách boli realizované obrazové záznamy a merania výšky ornamentácie spór pomocou mikroskopu pripojenej minikamery Moticam 1000 s použitím softvéru Motic Images 2.0 ML. Pred samotnými meraniami bola vykonaná kalibrácia za pomocí priloženého kalibračného podloženého sklíčka (metóda kalibračných bodov). Na zhotovených obrazových záznamoch boli uskutočnené merania výšky ornamentácie spór v súlade s metódou popisovanou v práci Chevalier et al. (1979) pri ktorej je dĺžka spóry odmeraná vrátane a bez ornamentácie spór. Výška ornamentácie spór je potom vypočítaná delením rozdielu meraní dvomi. Každá vzorka bola odoberaná z viacerých častí gléby.

Na meranie dĺžky ornamentácie sme použili len zrelé (vyfarbené) spóry nachádzajúce sa v nepoškodených vreckách. Kedže počet spór vo vreckách kolíše, do merania sme vyberali len tie spóry ktoré sa nachádzali vo vreckách v počte štyri. Následne sme z každého vrecka analyzovali len jednu spóru, čo sme opakovali pri 15 vreckách na jednu plodnicu. Získané súbory dát – výšky ornamentácie boli štatisticky spracované a vyhodnotené pomocou t-testu.

## Výsledky a diskusia

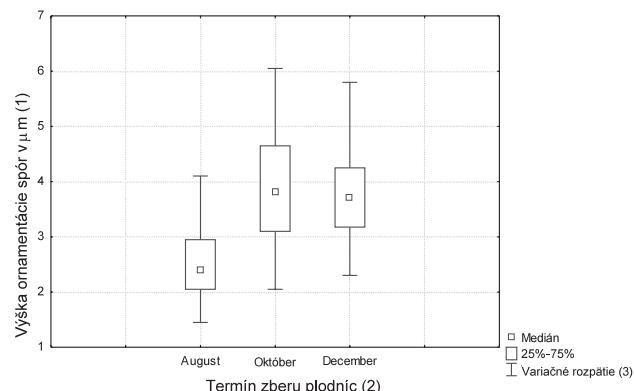
Výsledky merania výšky ornamentácie spór hľuzovky letnej sú v podobe popisnej štatistiky uvedené v tabuľke 1. Plodnice získané počas leta v mesiaci august mali v priemere najnižšiu výšku ornamentácie spór  $2,6 \pm 0,07 \mu\text{m}$  s najvyššou mierou variabilitu vyjadrenou vo variačnom koeficiente 29%, rozdiel medzi najvyššou a najnižšou nameranou hodnotou bol medzi sledovanými obdobiami najväčší. 25% zo všetkých meraných bol nižších než  $2,1 \mu\text{m}$ . Plodnice boli na priereze typicky svetlo hnedo mramorované, aróma pri subjektívnom hodnotení bola viac hubová, menej typicky hľuzovková. Plodnice získané na jesenné počas októbra mali priemernú výšku ornamentácie spór  $3,9 \pm 0,09 \mu\text{m}$  s úrovňou variabilitu 25% avšak s najvyššou hodnotou variačného rozpätia  $4 \mu\text{m}$ . 25% zo všetkých meraných bol vyšších než  $4,6 \mu\text{m}$ . Plodnice mali pri subjektívnom hodnotení výraznú hľuzovkovú arómu. Plodnice nazbierané v zime počas decembra mali priemernú výšku ornamentácie spór  $3,8 \pm 0,09 \mu\text{m}$  s najnižšou variabilitu vyjadrenou cez variačný koeficient na úrovni 22%. Analýza vzoriek pochádzajúcich zo zimného odberu odhalila výskyt morfológicky nevyvinutých spór vo vreckách. Pri subjektívnom hodnotení aróma plodnícky bola sice hľuzovková, ale menej výrazná než pri plodničiach získaných v októbre.

Niektoči autorci odporúčajú aby plodnice s výškou ornamentácie spór okolo  $2 \mu\text{m}$  boli klasifikované ako *T. aestivum* a plodnice s výškou ornamentácie spór okolo  $4 \mu\text{m}$  ako *T. uncinatum* (Chevalier and Frochot, 1997; Gross, 1987). Rozdelenie podľa tejto metódy však nerieši otázku kam zaradovať plodnice ktoré

**Tabuľka 1** Popisná štatistika nameranej výšky ornamentácie spór v  $\mu\text{m}$  pre rozličné obdobia odberu plodnícky

	August	Október	December
Priemer (1)	2,6	3,9	3,8
Str. chyba priemeru (2)	0,07	0,09	0,09
Medián (3)	2,4	3,8	3,7
Modus	2,25	2,7	3,2
Smer. odchýlka (4)	0,73	0,97	0,84
Minimum	1,45	2,05	2,3
Maximum	4,55	6,05	5,8
Variačné rozpätie (5)	3,1	4	3,5
Variačný koeficient (6)	29%	25%	22%
Špicatost (7)	0,01	-0,75	-0,46
Šikmost (8)	0,70	0,38	0,44
Počet (9)	120	105	90

**Table 1** Descriptive statistics of measured height of spore reticulum in  $\mu\text{m}$  for different dates of fruit body collection  
(1) average, (2) standard error, (3) median, (4) standard deviation, (5) range, (6) variation coefficient, (7) kurtosis, (8) skewness, (9) count



**Obrázok 1** Grafické znázornenie variability výšky ornamentácie spór v odlišných termínoch zberu plodnícky

**Figure 1** Box plot of spore reticulum height in different dates of fruit bodies collection  
(1) height of spore ornamentation in  $\mu\text{m}$ , (2) dates of fruit bodies collection, (3) range

majú rozmerové parametre ornamentácie medzi týmito hraničnými hodnotami. Ďalším problémom je presnosť mikroskopickej analýzy. Wedén et al. (2005) uvádzajú, že presnosť postupu je ovplyvnená optickými chybami merania vzhľadom na orientáciu spór k rovine mikroskopického skločka.

Plodnice ktoré sú predmetom obchodu a sú označované ako *T. aestivum* a *T. uncinatum* sú len zriedkavo hodnotené mikroskopicky, ale častejšie na základe vône a farby gléby. Tie-to dva parametre hospodárskej kvality sú navzájom prepojené, pretože tmavšia gléba indikuje zrelosť spór a iba zrelé hľuzovky tvoria arómu (Wedén et al., 2004).

Obrázok 1 nám prehľadne charakterizuje variabilitu výšky ornamentácie spór pri vzájomnom porovnaní spór pochádzajúcich z plodnícky v analyzovaných mesiacoch prostredníctvom mediánu, kvartílov a variačného rozpätia. Je zrejmé, že výška ornamentácie spór môže byť ovplyvnená okrem genetických faktorov aj aktuálnym vývojovým stupňom plodnícky, zdravotným stavom plodnícky, miestnymi ekologickými podmienkami a tiež použitou technikou merania. Naše merania potvrdili, že individuálne merania spór sú variabilné aj v rámci opakovanych meraných tej istej plodnícky. V prípade októbrových plodnícky je variačné rozpätie hodnôt najvyššie. V takomto prípade je možné analyzovať dátu vhodnou štatistickou metódou až pri dodržaní dostatočného rozsahu experimentálneho súboru dát.

Pri štatistickom testovaní rozdielov priemerov medzi jednotlivými mesiacmi zberu plodnícky sme na základe t- testu zistili, že medzi priemernou výškou ornamentácie spór pochádzajúcich z augusta a októbra je štatisticky vysoko preukazný rozdiel. Rovnako sme potvrdili štatisticky vysoko preukazný rozdiel medzi priemernou výškou ornamentácie spór získaných v auguste a decembri. Naopak, medzi výškou ornamentácie spór nazbieraných v októbre a decembri sme zistili štatisticky nepreukazný rozdiel. Naše merania teda potvrdili, že spóry získané z plodnícky v mesiaci august mali najnižšiu výšku ornamentácie a na základe tohto znaku by sme ich mohli zaradiť do skupiny „aestivum“. Spóry z plodnícky získaných v mesiacoch október a december mali v priemere vyššie hodnoty ornamentácie spór ktoré by sme mohli zaradiť do skupiny „uncinatum“.

Podľa Paolocci et al. (2004) majú ekologicke faktory predstavovať väčšiu váhu než genetická podmienenosť morfológie spór, chuti a vône medzi hľuzovkami označenými ako *T. aestivum* a *T. uncinatum*. To naznačuje, že špecifické, stále neznáme pôdne a klimatické podmienky môžu indukovať tvorbu

plodníc pre *T. aestivum*, pričom tieto podmienky by na druhej strane mohli ovplyvňovať arómu plodníč, morfológiu spór a plodníč ktoré dávajú vznik morfotypom *T. aestivum* a *T. uncinatum*. Vzhľadom na široké rozpätie ekologických podmienok lokačít (Wedén et al., 2001), rastie *T. aestivum* v podmienkach menej vhodných pre rozvoj arómy. Podľa Wedén et al. (2004) plodnice *T. aestivum* so slabou úrovňou arómy je možné nájsť počas suchých rokov, alebo počas letných mesiacov. Rovnako plodnice rastúce plynko pod povrchom pôdy počas horúceho a suchého počasia môžu dozrievať predčasne, bez rozvoja typickej chuti a vône. Podľa Pacioni et al. (1993) bola zaznamenaná produkcia oboch typov plodníč na jednej hostiteľskej drevine.

Ak by sa potvrdili tieto pozorovania, strácalo by význam použitie odlišných typov pri selektívnej inokulácii hostiteľských drevín a pri uchovávaní genetických zdrojov hľuzoviek.

Naša práca potvrdila, že vzorky plodníč hľuzovky letnej odobrané v letnom, jesennom a zimnom období sa z hľadiska parametra výšky ornamentácie spór skutočne odlišujú a podľa toho môžeme konštatovať výskyt oboch typov (*aestivum* a *uncinatum*). Z pestovateľského hľadiska je žiaduci na hľuzovkových výsadbách čo najväčší podiel formy *uncinatum*. Kedže nie je v súčasnosti úplne jasná genetická podmienenosť či vplyv podmienok prostredia na obdobie dozrievania plodníč hľuzoviek, je nutné tieto vzťahy nadalej študovať. Pre inokulačné postupy tvorby mykorizovaných sadeníc, ako aj uchovávanie genetických zdrojov však neodporúčame plodnice z neskorých zberov (december), nakoľko v tomto období je v plodničiach vysoký podiel nevyzretých askospór.

## Súhrn

Cieľom práce bolo porovnať výšku ornamentácie spór pochádzajúcich z plodníč hľuzoviek získaných v priebehu leta (august), jesene (október) a zimy (december) a na základe výsledkov stanoviť možnosť použitia mikroskopickej analýzy spór pri určovaní rozdielov medzi *T. aestivum* a *T. uncinatum*. Naše merania potvrdili štatisticky vysoko preukazný rozdiel medzi výškou ornamentácie spór z leta oproti jesenným a zimným spóram. Štatisticky nepreukazný rozdiel sme zistili medzi výškou ornamentácie spór z plodníč nazbieraných na jeseň a v zime. Vysoké hodnoty variacného koeficientu nameraných údajov ( $V\% = 22-29\%$ ) naznačujú, že mikroskopická analýza spór je použiteľná len pri väčších súboroch údajov. Individuálne merania spór sa prejavili vysokou variabilitou v rámci tej istej plodnice. Analýza vzoriek pochádzajúcich zo zimného odberu odhalila výskyt morfológicky nevyvinutých – bezfarebných spór vo vreckách čo má veľký význam pre optimalizáciu inokulačných techník na výrobu mykorizovaných sadeníc a pre uchovávanie genetických zdrojov hľuzoviek.

**Kľúčové slová:** *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, spóra, výška ornamentácie

Práca sa realizovala v rámci projektov VEGA č. 1/4439/07 a VEGA č. 1/0643/09.

## Literatúra

- FISCHER, E. 1897. Tuberaceen und Hemiasseen. In: Die pilze Deutslands, Österreichs und der Schweiz. V. Ascomyceten. L. Rabenhorst's Kryptogamen-flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, vol. 8, 1897, p. 1-42.
- GANDEBOEUF, D. – DUPRÉ, C. – ROECKEL-DREVET, P. – NICOLAS, P. – CHEVALIER, G. 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. In: Can J Bot, vol. 75, 1997, p. 36-45.
- GAŽO, J. – MIKO M. – CHEVALIER, G. 2005. Prvé poznatky v inventarizačného výskumu hospodársky významných druhov hľuzoviek (*Tuber*), In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 11, 2005, č. 3, s. 66-71.
- GROSS, G. 1987. Zu den europäischen Sippen der Gattung *Tuber*. In: H. Derbsch and J. A. Schmitt, Editors, Atlas der Pilze des Saarlandes, Teil 2: Nachweise, Ökologie, Vorkommen und Beschreibungen, vol. 3, 1987, p. 79-99.
- HENRION, B. – CHEVALIER, G. – MARTIN, F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. In: Mycological research, vol. 98, 1994, p. 37-43.
- CHEVALIER, G. – GRENTÉ, J. 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: Production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). In: Mushroom Science, vol. 10, 1979, p. 483-505.
- CHEVALIER, G. – DESMAS, C. – FROCHOT, H. – RIOUSSET, L. 1979. L'espèce *Tuber aestivum* Vitt.: I. Définition. In: Mushroom Science, vol. 10, 1979, p. 957-975.
- CHEVALIER, G. – FROCHOT, H. 1997. La truffe de Bourgogne. Éditions Pétrarque, Levallois-Perret, 1997, 257 p. ISBN 2-911730-13-5.
- MONTECCHI, A. – SARASINI M. 2000. Fungi ipogei d'Europa. Associazione Micologica Bresadola, Trento, Italy. 2000. 230 p.
- MELLO, A. – CANTISANI, A. – VIZZINI, A. – BONFANTE, P. 2002. Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. In: Environ Microbiol, vol. 24, 2002, p. 584-594.
- OLIVIER, J. M. – SAVIGNAC, J. C. – SOURZAT, P. 1996. Truffe et trufficulture. Ed. Fanlac. Francia : Périgueux, 1996. 263 s. ISBN 2-86577-180-6.
- PACIONI, G. – FRIZZI, G. – MIRANDA, M. – VISCA, C. 1993. Genetics of a *Tuber aestivum* population. In: Mycotaxon, vol. 7, 1993, p. 93-100.
- PAOLOCCHI, F. – RUBINI, C. – RICCIIONI, C. – TOPINI, F. – ARCIIONI S. 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? In: FEMS Microbiol lett, vol. 23, 2004, p. 109-115.
- WEDÉN, C. – DANELL, E. 1998. Sommartryffel, *Tuber aestivum*, och andra tryfflar i Sverige. (*Tuber aestivum* and other truffles in Sweden). In: Svensk Botanisk Tidskrift, vol. 92, 1998, p. 65-80.
- WEDÉN, C. – ERICSSON, L. – DANELL, E. 2001. Research on *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* and *T. mesentericum* reported from Sweden for the first time. In: Svensk Botanisk Tidskrift, vol. 95, 2001, p. 205-211.
- WEDÉN, C. – CHEVALIER, G. – DANELL, E. 2004. *Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. In: Mycological Research, vol. 108, 2004, p. 304-310.
- WEDÉN, C. – DANELL, E. – TIBELL, L. 2005. Species recognition in the truffle genus *Tuber* – the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. In: Environmental Microbiology, vol. 7, 2005, p. 1535-1548.

### Kontaktná adresa:

Ing. Ján Gažo, PhD., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FÁPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel.: +421/37/641 42 28, e-mail: Jan.Gazo@uniag.sk