

# LUCHA QUÍMICA CONTRA EL CONTAMINANTE *Sphaerospora brunnea* (Alb. et Schwein.) Svrcek et Kubicka, RESPONSABLE DE “LA MICORRIZA MARRÓN” DE LOS INVERNADEROS DE PRODUCCIÓN DE PLANTA MICORRIZADA CON TRUFA NEGRA (*Tuber melanosporum* Vitt.)

PALAZÓN Carlos (1); BARRIUSO Juan (2); DELGADO Ignacio (1)

(1) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria. Gobierno de Aragón. Apartado 727. 50080 Zaragoza, España.

E-mail: [cpalazon@aragon.es](mailto:cpalazon@aragon.es)

(2) Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Ctra. Cuarte s/n. 22071 Huesca,

E-mail: [barriuso@unizar.es](mailto:barriuso@unizar.es)

**Palabras clave:** micología, ectomicorrizas, fungicidas, viveros, *Quercus ilex*

## RESUMEN

La “micorriza marrón” de los invernaderos, debida a *Sphaerospora brunnea* Alb. et Schwein., constituye una de las principales amenazas para aquellos viveros dedicados a la producción de planta micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). Cuando las condiciones le son favorables, este ascomiceto es capaz de formar micorrizas con la planta huésped, instalándose en ellas con una precocidad mayor que la de *T. melanosporum* lo que inhabilita la posibilidad de que las raíces tróficas de las plantas sean ocupadas por este último. El trabajo presentado recoge diversas experiencias realizadas “in vitro” e “in vivo” para determinar la eficacia contra *S. brunnea* de las materias activas fungicidas utilizadas y la influencia de las mismas en el proceso de micorrización con *T. melanosporum*, concluyendo en la poca eficacia de las mismas en los tratamientos curativos contra el contaminante.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El desarrollo experimentado por la truficultura en los últimos años, se ha fundamentado en gran medida por el perfeccionamiento de las técnicas de micorrización utilizadas a gran escala por los viveros de producción. Sin embargo no es de extrañar que, en ocasiones, la aparición de “la micorriza marrón de los invernaderos” debida al discomiceto *Sphaerospora brunnea* (Alb. et Schwein.) Svrcek et Kubicka, pueda comprometer con sus infestaciones la producción anual de dichos viveros, al instalarse de modo simbiótico en el aparato radical de las plantas de manera preponderante, compitiendo por los mismos espacios de manera más rápida e impidiendo, por tanto, que el inóculo esporal de *Tuber melanosporum* pueda acceder a las raíces e iniciar el proceso de simbiosis deseada por el viverista (Foto 1).

En trabajos anteriores (LACAL, 2000) sugería la utilización de medidas preventivas para el control de *S. brunnea*, destacando la recomendación de utilizar sustratos de cultivo alcalinos, cercanos a los 8,5 puntos, coincidiendo con los trabajos de DONNINI et al. (1997), en los que preconizaban el uso de sustratos sub-alcalinos para evitar dicho competidor.

Otro factor importante reseñado por LACAL (2000) hacía referencia al control de la humedad y de la temperatura, procurando una buena ventilación de los túneles o invernaderos, para mantener la temperatura en valores inferiores a 30° C y provocando asimismo un descenso de la humedad relativa, factores ambos con una gran influencia en la contaminación por *S. brunnea*.

La proximidad desde el punto de vista sistemático entre los dos hongos citados, integrados en la clase *Ascomycete* y orden *Peiziales*, ofrecía serias dudas para poder acometer la lucha química en invernadero, mediante la utilización de fungicidas selectivos específicos.

LACAL (2000) estudió medidas complementarias que integrasen la aplicación de algún fungicida selectivo contra *S. brunnea* pero con escasa afectación a la micorrización por *T. melanosporum*; sin embargo, de las numerosas materias activas empleadas en sus experiencias, solamente el triflumizol mantuvo, a dosis bajas de 10 ppm, una actividad fungicida notable, aunque el coste de su utilización se tradujo en una reducción de la micorrización por *T. melanosporum*, que bajó del 51 % en los testigos no tratados hasta el 26% en las plantas tratadas con el fungicida.

Estos primeros datos, unidos a referencias que recomendaban el uso del benomilo en los viveros forestales de micorrización de *Pinus echinata* Mill. con *Pisolithus tinctorius*, precisamente por favorecer la producción de micorrizas eliminando posibles antagonistas del suelo (PAWUK y BARNETT, 1981), sugirieron la realización de un experimento de lucha química contra *S. brunnea* en el que se incluyeran ambos fungicidas y en el que se determinase la eficacia de los mismos, tanto “in vitro” como “in vivo”, a partir de ensayos biológicos en invernadero.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Ensayo “in vitro”

Se estudiaron 4 materias activas fungicidas: triflumizol, benomilo, pirimetanil y cobre en forma organo-sulfatada.

El ensayo se realizó con dichos fungicidas, a 5 concentraciones diferentes: 0,1, 1, 10, 100 y 1000 ppm., mediante el método de su vertido en medio PDA en subfusión. Una vez enfriado el medio, se procedía a transferir en el centro de las placas una rondela de cultivo puro de *S. brunnea* en medio agarizado, midiendo con el paso de los días los halos de crecimiento de dicha colonia para las distintas concentraciones.

El protocolo del ensayo comprendía pues 4 materias activas fungicidas x 5 concentraciones x 3 repeticiones por fungicida y concentración, reservando 3 placas testigo, sin fungicida sembradas con el hongo.

El ensayo se consideró finalizado cuando las placas testigo fueron cubiertas en su totalidad por el micelio de *S. brunnea*, aunque se siguieron haciendo notaciones del resto de las placas hasta 8 días después de la siembra.

### Ensayo “in vivo”

Se realizó en invernadero de cristal climatizado. Las plantas utilizadas procedían de bellotas de una encina milenaria de una antigua zona trufera. Las bellotas, previamente seleccionadas y desinfectadas, fueron sembradas en un lecho de vermiculita nº 3, regando 2-3 veces por semana, intentando mantener una humedad adecuada para su germinación y crecimiento.

La micorrización con *T. melanosporum* se realizó a los 3 meses de la siembra, mediante el procedimiento de espolvoreo con talco y un triturado seco del hongo, descrito por CARTIÉ et al. (2000), a la dosis de 1,5 gramos por planta, en estado fenológico de 6-8

hojas. Se micorrizaron 3 lotes de 20 plantas, escalonados en 10 días (28/04/03, 08/05/03, y 18/05/03).

La inoculación con *S. brunnea* se realizó el 21/07/03, aproximadamente a los 155 días de la siembra y con un margen mínimo desde la micorrización, de 60 días. Las plantas fueron inoculadas mediante el riego con 10 ml de una suspensión de esporas de la forma holomórfica de *S. brunnea*, a la concentración de 250.000 esporas/ml.

En todos los lotes se realizaron 4 tratamientos curativos ó post-infección, del siguiente modo:

*Tratamiento 1:* Riego en cada contenedor (400ml) con 20 ml de benomilo a 1.000 ppm, 30 días después de la inoculación con *S. brunnea*, repitiendo el tratamiento con una frecuencia de 3 semanas.

*Tratamiento 2:* Igual al tratamiento 1, pero con una frecuencia de 4 semanas.

*Tratamiento 3:* Igual al tratamiento 1, pero con una frecuencia de 5 semanas.

*Tratamiento 4:* Plantas testigo micorrizadas e inoculadas, sin tratamiento con benomilo.

El protocolo del ensayo comprendía 3 lotes de plantas x 4 tratamientos fungicidas (incluido el testigo) x 5 repeticiones por tratamiento y lote, lo que hacía un total de 60 plantas.

El ensayo se consideró finalizado 9 meses después de la micorrización, momento en el que las plantas se sacaron de sus contenedores para identificar y evaluar los porcentajes de las micorrizas existentes sobre el total de raíces, de acuerdo con la metodología descrita por PALAZÓN et al. (2000).

## RESULTADOS OBTENIDOS

### Ensayo “in vitro”

Los resultados obtenidos se resumen en la TABLA 1, confirmando la eficacia del fungicida triflumizol, incluso a dosis relativamente bajas, de acuerdo con resultados anteriores de otros autores (LACAL, 2000). El benomilo es la materia activa que mejores resultados ha proporcionado, manteniendo una actividad fungistática a 1ppm. y ralentizando el crecimiento de las colonias a la dosis mínima de 0,1 ppm. (Foto 2)

Estos últimos resultados, unidos a las referencias de otros autores recomendando el benomilo para evitar la acción de antagonistas en el proceso de micorrización de *P. echinata*. (PAWUK y BARNETT, 1981), nos indujo a elegir a dicha materia activa fungicida para la realización de los ensayos biológicos en invernadero.

### Ensayo “in vivo”

A pesar de que la inoculación con *S. brunnea* se realizó como mínimo (Lote 3) dos meses después de la micorrización con *T. melanosporum*, la incidencia del contaminante ha sido muy alta en todos los casos, resumiéndose los resultados en la TABLA 2.

De acuerdo con los mismos se puede ver que el benomilo ha sido absolutamente ineficaz, en las condiciones del ensayo, para el control de “la micorriza marrón de los invernaderos”, descartándose la realización de análisis estadístico.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir en que *Sphaerospora brunnea* (Alb. et Schwein.) Svrcek et Kubicka, es un contaminante de vivero muy difícil de erradicar por el procedimiento de lucha química curativa, al no disponer de fungicidas selectivos para su control, con escasa incidencia en las micorrizas de *T. melanosporum*.

Al contrario de lo esperado, los testigos no tratados con el fungicida, han mostrado una micorrización por *T. melanosporum*, del 7,2 % y 9,1 % en los lotes 1 y 3 respectivamente, valores muy bajos pero suficientemente explicativos para concluir en la inoportunidad de los tratamientos con este fungicida, al inhibir totalmente la micorrización por *T. melanosporum* en todas las plantas de los diferentes lotes.

Aunque el benomilo fue retirado del mercado en febrero de 2004, podría, caso de haber obtenido resultados esperanzadores, utilizar alguna otra molécula del grupo de los benzimidazoles actualmente autorizadas, v. gr. carbendazima, tiabendazol, que pudiera sustituirla.

La realización de ensayos futuros de lucha química contra este contaminante de viveros, debería ir dirigida hacia las aplicaciones preventivas de productos fungicidas, buscando nuevas moléculas existentes en el mercado de productos fungicidas, que puedan aportar alguna acción selectiva. Su aplicación para el control de *S. brunnea* debería englobarse dentro de un conjunto de medidas culturales preventivas, entre las que habría que contemplar el uso de sustratos alcalinos en torno a los 8,5 puntos, la ventilación adecuada de los invernaderos y la utilización de agua de calidad, libre de materia orgánica y residuos en suspensión, para el riego de las plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

CARTIÉ, G.; PALAZÓN C.; DELGADO I. y BARRIUSO J.; 2000. Influencia del método de inoculación, del tipo de sustrato y de la procedencia de la trufa, en la micorrización de *Quercus ilex* L. por *Tuber melanosporum* Vitt., y en la supervivencia de las plantas. Actas V International Congress Science and Cultivation of Truffle, 6.296-6.299, Aix-en-Provence (Francia).

DONNINI, D.; BENCIVENGA, M.; CALANDRA, R. y TANFULLI, M.; 1997. Influenza della reazione del sustrato sulla micorrizzazione di *Ostrya carpinifolia* Scop. con *Tuber melanosporum* Vitt. e *Sphaerospora brunnea* ( A. e S. ) Svrcek e Kubicka. Micologia Italiana. 1997, 3, Pag 17 – 22.

LACAL, G.; 2000. Proyecto Fin de Carrera presentado por Guillermo Lacal Alonso en la Escuela Universitaria Politécnica de Huesca - Ingeniería Técnica Agrícola en Explotaciones Agropecuarias, con el título “Estudios básicos para el control de *Sphaerospora brunnea* (A. and S. ex Fr.) en los viveros de producción de encina (*Quercus ilex* L.) micorrizada con trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.). Huesca, 21 de diciembre de 2000.

PALAZÓN, C.; CARTIÉ, G.; DELGADO, I. y BARRIUSO J.; 2000. Propuesta de un método de evaluación y control de calidad de planta (*Quercus* spp.) micorrizada con *Tuber melanosporum* Vitt. para la obtención en España de la etiqueta de certificación. Actas V International Congress Science and Cultivation of Truffle, 6.311-6.313, Aix-en-Provence (Francia).

PAWUK, W. y BARNETT, J.; 1981. Benomyl stimulates ectomycorrhizal development by *Pisolithus tinctorius* on shortleaf pine grown in containers. Southern Forest Experiment Station T-I0210, Forest Service-USDA, Pineville, La. 71360.

-  
-

AGRADECIMIENTOS

- Este trabajo ha sido subvencionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), fondos FEDER, en el marco del Programa Sectorial de I + D Agrario y Alimentario del MAPA, Proyecto SC00-013.

Tabla 1.- Halos de crecimiento en mm. de *Sphaerosporella brunnea*, con las diferentes materias activas fungicidas ensayadas, a diferentes dosis.

tiempo (días)	cubiet 50%p/v			benomilo 50%p/p				triflumizol 30%p/p				pirimetanil 40%p/v			
	2	4	6	2	4	6	8	2	4	6	8	2	4	6	8
1000ppm	24	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0*	0	0	0	0
	23	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0*	0	0	0	0
	24	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0*	0	0	0	0
	<b>23,7</b>	<b>85</b>	---	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
100ppm	37	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0+	10	54	85	---
	36	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0+	13	53	85	---
	41	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	0+	17	47	85	---
	<b>38</b>	<b>85</b>	---	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0+</b>	<b>13,3</b>	<b>51,3</b>	<b>85</b>	---
10ppm	41	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	3+	40	85	---	---
	42	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	3+	44	85	---	---
	40	85	---	0	0	0	0*	0	0	0	3+	41	85	---	---
	<b>41</b>	<b>85</b>	---	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3+</b>	<b>41,7</b>	<b>85</b>	---	---
1ppm	44	85	---	0	0	0	0+	5	9	12	15	35,5	85	---	---
	43,5	85	---	0	0	0	0+	5	9	12	13	44	85	---	---
	38	85	---	0	0	0	0+	5	8	10	14	32	85	---	---
	<b>41,8</b>	<b>85</b>	---	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0+</b>	<b>5</b>	<b>8,7</b>	<b>11,3</b>	<b>14</b>	<b>37</b>	<b>85</b>	---	---
0,1ppm	38	85	---	14	26	30	45	11,5	34	49	85	37	85	---	---
	38,5	85	---	16	36	47	55	19	43	57,5	85	40	85	---	---
	34	85	---	11,5	31	40	43	11,5	35	50	85	35	85	---	---
	<b>37</b>	<b>85</b>	---	<b>13,8</b>	<b>31</b>	<b>39</b>	<b>47,6</b>	<b>14</b>	<b>37,3</b>	<b>52</b>	<b>85</b>	<b>37,3</b>	<b>85</b>	---	---
Testigos	34,5	85	---												
	34	85	---												
	36,5	85	---												
	<b>35</b>	<b>85</b>	---												

\* Fungicida

+ Fungistático

Tabla 2.- Porcentajes de micorrización por *Sphaerosporella brunnea* y por *Tuber melanosporum*, según los tratamientos

Lote	Muestra	Fecha inoculación T.m.	Fecha siembra	Fecha inoculación S.b.	Benomilo/3semanas		Benomilo/4semanas		Benomilo/5semanas		Sin benomilo		
					%S.b.	%T.m.	%S.b.	%T.m.	%S.b.	%T.m.	%S.b.	% T.m.	% micorrización
1	1	28/04/03	5/02/03	21/07/03	40,2	0	29,1	0	43,3	0	29,5	13,3	43
	2				18,6	0	32,9	0	34,8	0	45	6,7	52
	3				21,6	0	16,3	0	43,1	0	30,3	16	46
	4				22,6	0	23,3	0	28	0	10	0	10
	5				29,5	0	38,7	0	62,7	0	10	0	10
	media				26,5	0	28,1	0	42,4	0	25	7,2	32,2
2	1	8/05/03	5/02/03	21/07/03	29	0	43,2	0	47,6	0	13,3	0	13,3
	2				23,9	0	53,3	0	26,7	0	23,2	0	23,2
	3				34	0	67	0	28,7	¿?	11,3	0	11,3
	4				22,4	0	43,5	0	53	1	16,7	0	16,7
	5				38	0	59,3	0	38,4	0	15	0	15
	media				29,5	0	53,3	0	39	0	16	0	16
3	1	18/05/03	5/02/03	21/07/03	33	0	36,4	0	38,3	0	13	0	13
	2				31	0	44,6	0	29	0	0	0	0
	3				38,2	0	52	0	41,7	0	1,7	7	8,7
	4				46	0	53	0	42,3	0	11,3	12	24,3
	5				50,3	0	57,7	0	41,6	0	25	26,7	51,6
	media				39,7	0	48,7	0	39	0	10,2	9,1	19,5

S. b.: *Sphaerosporella brunnea*

T.m.: *Tuber melanosporum*

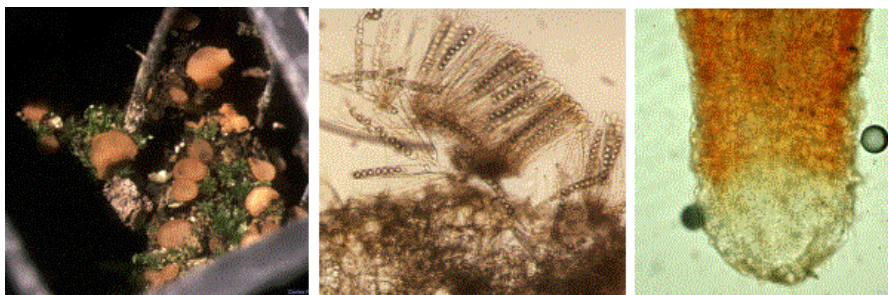


Foto 1.- Carpóforo, ascas y ápice de la micorriza de *Sphaerosporella brunnea*.

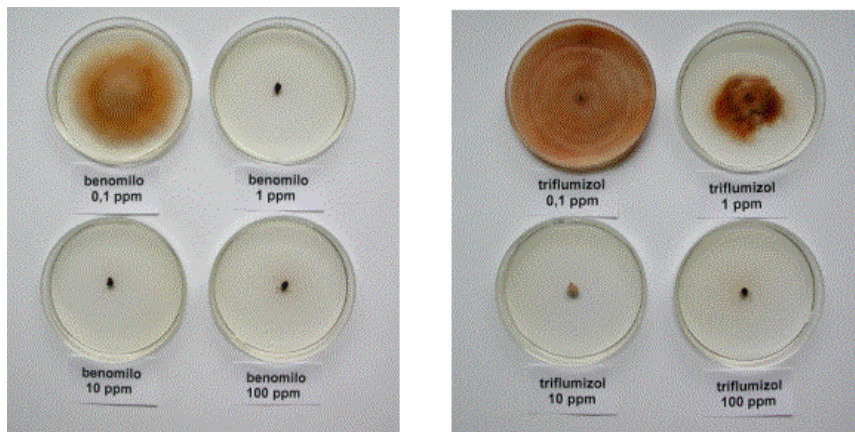


Foto 2.- En los ensayos “in vitro” destaca la acción fungicida del benomilo y triflumizol.