**CAPACIDAD INFECTIVA DE HONGOS PATÓGENOS EN TEJIDOS SEMINALES**
**MÉTODOS DE CONSECUCIÓN DE SEMILLA LIBRE DE ENFERMEDADES**

Muruamendiaraz, A., Diaz de Cerio, I.; Gonzalez de Murillo, M.; Ortiz Barredo, A. Iturritxa, E.
eiturritxa@neiker.net
NEIKER. Granja Modelo – Arkaute. Apdo. 46. 01080 Vitoria-Gasteiz **NEIKER. Granja Modelo**

**Resumen**

Se estudia la capacidad de penetración de los hongos, en condiciones naturales y por inoculación artificial, en las diferentes capas del tejido seminal, corteza, gametófito y embrión en semilla del género Pinus radiata procedente de plantaciones del País Vasco.

Mediante un procedimiento de análisis de la infección por separación de las diversas capas se determina la capacidad de penetración del hongo.

Se lleva a cabo un método de inoculación de semillas para contrastar la eficacia de los diferentes tratamientos. Se estudia la incidencia en la afección de las diversas capas de semilla por el hongo patógeno, Sphaeropsis sapinea, tras su tratamiento con diversas sustancias activas, sustancias químicas (Tebuconazole e Hipoclorito sódico) biológicas (aceite esencial de Tomillo Rojo) y antagonistas (Trichomic). Contra los patógenos asociados a la corteza de la semillas, la desinfección con hipoclorito de sodio o peróxido de hidrógeno suele ser efectivo. La combinación de este método con el uso de fungicidas selectivos puede proporcionar un control eficaz frente a patógenos externos e internos de la semilla.

**Palabras clave**: embrión, *Pinus radiata, Sphaeropsis sapinea*, fungicida.

## INTRODUCCIÓN

Una de las vías importantes de entrada de enfermedades en nuevos ecosistemas se produce a través de las semillas procedentes de áreas foráneas.

Actualmente existen numerosos ejemplos de situaciones devastadoras que han incidido claramente en mantenimiento de la sostenibilidad de las masas de bosques nativos, provocadas por hongos cuya introducción original se produjo por esta vía. Adicionalmente los hongos patógenos de semillas inciden negativamente en la germinación y posterior desarrollo de la planta.

En este contexto resulta de especial interés el estudio de materias activas y formas de aplicación de los tratamientos preventivos dirigidos a evitar o minimizar el impacto causado por este fenómeno y la eficacia de la metodología empleada en la detección de la afección fúngica en semillas (Besnier, 1989).

## MATERIAL Y METODOS

a-Estudio de la capacidad de penetración de hongos forestales en semilla de pino radiata, infección natural

A partir de una muestra procedente de un lote correspondiente a semilla rodal semillero (Aproximadamente el 95 % de las plantaciones del Pais Vasco proceden de esta semilla).Se analizan 125 semillas, separando las tres capas que la constituyen, testa, gametofito y embrión. Cada una de ellas se cultiva en placas de Petri en medio de PDA (agar patata dextrosa).

Las placas junto los fragmentos de semilla se incuban a temperatura 22 ºC durante un periodo máximo de 2 semanas. Durante este tiempo las placas se supervisan cada 5 días y se anotan las especies de hongo que se van desarrollando sobre cada una de dichas partes (Atkiens & Iturritxa, 2004)

b-Estudio de la capacidad de penetración de hongos forestales en semilla de pino radiata, inoculación artificial

Se estudió la capacidad de penetración e infección del hongo en semillas de pino radiata.

La semilla utilizada en este ensayo era procedente de rodal semillero del País Vasco.

El aislado utilizado en este ensayo procede de una muestra de Arrazua-Ibarrundia, perteneciente al morfotipo A (según rasgos morfológicos, Wang Cheng-Guo, 1985) .

Se aplicó el protocolo de inoculación de semillas y cultivo de las partes de la semilla por separado descrito en Atkiens & Iturritxa, (2004).

Se realizaron réplicas del cultivos en placas de Petri del hongo en medio de PDA (agar patata dextrosa). Las semillas se sometieron a una desinfección superficial sumergiendo durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 20 % .

A continuación, se procedió a inocular 300 semillas en las placas de cultivo del hongo. La mitad de las semillas se inocularon durante 1 semana en las placas, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, mientras que en la semillas restantes la inoculación se prolongó durante una semana más.

Una vez transcurrido el tiempo de inoculación, se sumergieron las semillas en agua destilada durante dos minutos, con el fin de eliminar los restos de micelio adherido a la corteza de las semillas. Seguidamente se procedió a separar y cultivar las diferentes partes de la semillas en placas de cultivo con PDA para comprobar el grado o porcentaje de infección en cada capa. Se procedió de la siguiente manera: 50 semillas se cultivaron sin manipularlas para evaluar la infección de la corteza, se les extrajo el gametofito a 50 semillas y se procedió a cultivarlas. Al resto de las semillas se les extrajo el embrión y se sometieron a una desinfección en hipoclorito de sodio (Lejía 20 %) para descartar los posibles contaminaciones inducidas durante la manipulación de extracción de los embriones. La mitad de los embriones se sumergieron durante 1 minuto y el resto durante 2 minutos.

Las placas se incubaron durante una semana en laboratorio en condiciones de 22ºC de temperatura y se procedió a la evaluación y recuento de partes de la semillas infectadas.

Después de evaluar los resultados en las semillas que fueron inoculadas durante una semana y observar que el porcentaje de la infección en el caso de la corteza y gametofito eran muy altas, se procedió únicamente a cultivar los embriones para evaluar el porcentaje de infección de los mismos, empleando la metodología anteriormente descrita.

Como control en la infección del embrión, se extrajo el embrión a semillas sin inocular de la misma procedencia y se cultivaron después de realizar las desinfecciones pertinentes.

c-Estudio de la eficacia de los tratamientos fungicidas en semilla de pino radiata, en el control de Sphaeropsis sapinea

Los tratamientos realizados en este ensayo fueron los siguientes:

Fungicida de origen químico: Folicur

Es un fungicida sistémico cuyo componente activo es el tebuconazole al 25%.

Se seleccionó por ser el fungicida que mejores resultados dio entre los que se testaron en el ensayo sobre el control químico in vitro (a excepción del Benomilo, cuyo uso ha sido prohibido).

Fungicida de origen biológico: Bio 75 Tomillo rojo.

El tomillo rojo es un extracto de *Thimus zigis*, que contiene aceite de tomillo del 38,2% en timol.

Organismos antagonistas: *Trichoderma spp*.

Trichomic©, formado por combinación de cepas de *Trichoderma viridae* y *Trichoderma harzianum*.

Desinfección con hipoclorito de sodio (Lejía 20%).

Las semillas se inocularon durante una semana con el aislado procedente de una muestra de Arrazua-Ibarrundia, perteneciente al morfotipo A (según rasgos morfológicos).

A excepción del tratamiento con hipoclorito de sodio, los tratamientos se realizaron cubriendo las semillas infectadas con el correspondiente fungicida y manteniendo en constante agitación hasta que el fungicida fuera absorbido por las semillas.

Las semillas se sometieron a las siguientes concentraciones de los diversos productos: Folicur, 0,5 gr en 2 ml, Tomillo rojo (2 ml), Trichomic© , 2 ml en una concentración de $10^9$ conidias viables por litro

Respecto al tratamiento de desinfección mediante hipoclorito de sodio se sumergieron las semillas durante 20 minutos en una solución al 15%.

Al igual que se realizó en el ensayo anterior, las semillas se separaron en tres partes: corteza, gametofito y embrión. Tanto el embrión como el gametofito se sometieron a una desinfección previa (un minuto sumergido en hipoclorito de sodio al 20% ) antes de ponerlas a cultivar en placas de PDA, para asegurar que no hubiera contaminación transmitida durante la manipulación de las semillas.

Las placas se mantuvieron en cultivo durante una semana y se procedió a cuantificar el porcentaje de infección en cada parte de la semilla.

**RESULTADOS**

El hongo patógeno más frecuentemente detectado en semilla fue *Sphaeropsis sapinea*, restringiéndose su presencia a la parte más exterior de la semilla, la testa. La presencia de hongos decrece en las zonas más internas, gametofito, siendo el embrión la parte de la semilla que permanece libre de invasión micótica en las condiciones de este ensayo. Figura 1.

En las semillas inoculadas artificialmente, durante un periodo de una semana, el porcentaje de infección de las distintas estructuras fue el siguiente: la corteza resultó infectada en el 96,3 % de las semillas, el gametofito en un 75 % y el hongo consiguió penetrar hasta el embrión en el 18, 18 % de los casos (Tabla 1).

Se han observado diferencias en cuanto a la infección en semillas inoculadas durante una y dos semanas. En las inoculadas durante una semana, el porcentaje de infección es del 18,52%. En las semillas inoculadas durante dos semanas se ha observado infección en 79,17%, mientras que en el control se ha observado un porcentaje de un 1%

Existe una relación significativa entre el tiempo que están las semillas sometidas al contacto del hongo y la capacidad de penetración e infección del mismo (Tabla 4). El porcentaje de los embriones infectados en las semillas inoculadas durante una semana aumenta considerablemente con respecto a las semillas inoculadas durante una semana.

La diferencia en los resultados de los porcentajes de infección obtenidos en embriones sometidos a una desinfección de 1 minuto y los sometidos a una desinfección de 2 minutos no es significativa, tal como se muestra el test de chi-cuadrado (Tabla 5). Por lo tanto, el tiempo de inmersión de los embriones en hipoclorito de sodio es independiente al porcentaje de infección de los mismos.

En lo referido a tratamientos funguicidas, los porcentajes de la incidencia de la infección en cada tratamiento y cada estructura de la semillas están resumidas en el siguiente cuadro:

De los cinco tratamientos a los que se sometieron las semillas se observó eficacia en dos de ellos: el fungicida químico Folicur y en el caso del compuesto de origen biológico, Tomillo rojo. Estos dos tratamientos han tenido efectividad en un 100% puesto que no se ha detectado infección por *Sphaeropsis sapinea* en ninguna estructura de las semillas impregnadas con estos productos (Gráficos 6 y 8).

Los resultados sobre porcentaje de infección referidos a la corteza, de la desinfección mediante hipoclorito de sodio no ha diferido con respecto a los datos sobre la corteza obtenidos en la semillas sin tratamiento (control) (Gráficoa 5, 7 y 10). En cuanto al tratamiento con el Trichoderma comercial, el porcentaje de infección apenas ha disminuido un 7% a nivel de la corteza (Gráfico 9).

Respecto al gametofito, tanto el tratamiento con hipoclorito, como con el Trichomic©, el porcentaje de infección a disminuido con respecto al control en un 15 y 11 % respectivamente. Por último, con respecto al embrión, en las semillas tratadas con hipoclorito de sodio la disminución en el porcentaje de infección ha sido de un 14%, mientras que en las semillas tratadas con Trichomic©, la reducción ha sido de un 7% (Gráficos 7 y 9

**CONCLUSIONES**

El hongo *Sphaeropsis sapinea*, es capaz de infectar tanto la corteza como penetrar en las semillas de pino radiata e infectar el gametofito en un porcentaje alto. El patógeno presenta mayor dificultad para alcanzar e infectar la estructura interna de la semilla, es decir, el embrión.

El método de inoculación más eficaz para la inoculación interior de las semillas se consigue dejando las semillas sobre micelio de hongo durante dos semanas, este método nos resultará utir para poder estimar si los diversos tratamientos funguicidas aplicados resultan efectivos en la desinfección externa e interna de las semillas.

En cuanto a las sustancias funguicidas analizadas destaca la eficacia de **Folicur**

Es un fungicida sistémico cuyo componente activo es el tebuconazole al 25%.

Se seleccionó por ser el fungicida que mejores resultados dio entre los que se testaron en el ensayo sobre el control químico in vitro (a excepción del Benomilo, cuyo uso ha sido prohibido).

Fungicida de origen biológico: Bio 75 Tomillo rojo.

El tomillo rojo es un extracto de *Thimus zigis*, que contiene aceite de tomillo del 38,2% en timol.

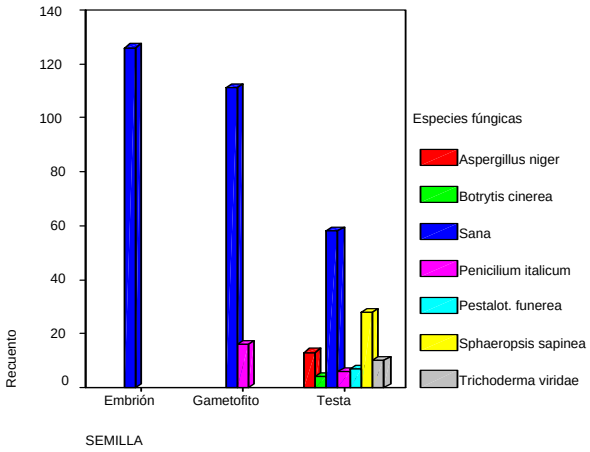



Figura 1: Resultados obtenidos al analizar semillas de Pinus radiata procedentes de rodal semillero cultivadas en medio agarizado PDA.

| TIEMPO DE INOCULACIÓN | PARTE DE LA SEMILLA | | PORCENTAJE DE INFECCIÓN (%) | |
|---|---|---|---|---|
| 1 SEMANA | TESTA | | Infectadas | **96,3** |
| | | | Sin infectar | 3,7 |
| | CAPA | | Infectadas | **90,39** |
| | | | Sin infectar | 9,61 |
| | GAMETOFITO | | Infectadas | **75** |
| | | | Sin infectar | 25 |
| | EMBRION | 1 MINUTO | Infectadas | **18,51** |
| | | | Sin infectar | 81,49 |
| | | 2 MINUTOS | Infectadas | **18,51** |
| | | | Sin infectar | 81,49 |
| 2 SEMANAS | EMBRION | 1 MINUTO | Infectadas | **70,83** |
| | | | Sin infectar | 29,17 |
| | | 2 MINUTOS | Infectadas | **87,5** |
| | | | Sin infectar | 12,5 |
| CONTROL | EMBRION | 1 MINUTO | Infectadas | **0** |
| | | | Sin infectar | 100 |
| | | 2 MINUTOS | Infectadas | **2** |
| | | | Sin infectar | 98 |

Tabla 1: Resultados conseguidos en cuanto a la desinfección de los embriones de las semillas inoculadas durante diferentes periodos de tiempo de la inoculación

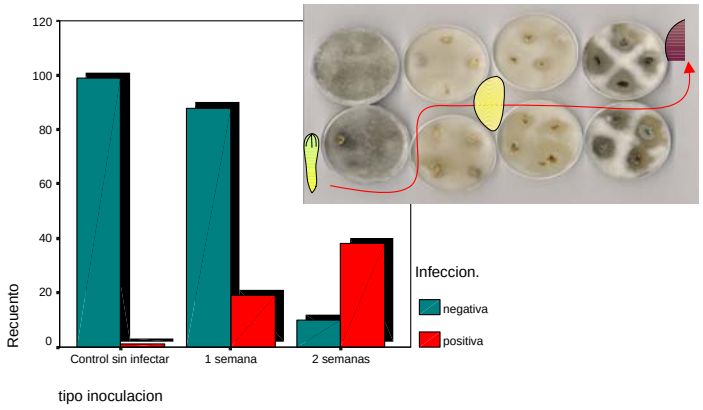


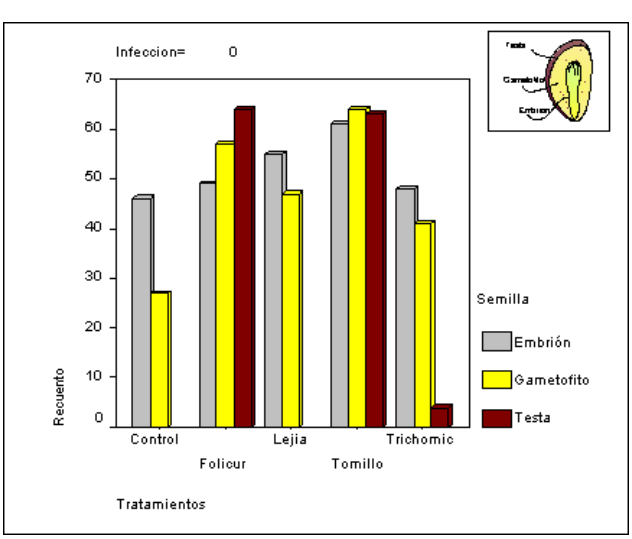

Figura 2: Porcentaje de infección en embriones de semillas inoculadas durante una y dos semanas.

Tabla de contingencia tratamientos * Semilla * Infeccion

Recuento

| Infeccion | | | Semilla | | | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Embrión | Gametofito | Testa | |
| 0 | tratamientos | Control | 46 | 27 | 0 | 73 |
| | | Folicur | 49 | 57 | 64 | 170 |
| | | Lejia | 55 | 47 | 0 | 102 |
| | | Tomillo | 61 | 64 | 63 | 188 |
| | | Trichomic | 48 | 41 | 4 | 93 |
| | Total | | 259 | 236 | 131 | 626 |
| 1 | tratamientos | Control | 11 | 16 | 56 | 83 |
| | | Lejia | 3 | 14 | 54 | 71 |
| | | Trichomic | 7 | 15 | 55 | 77 |
| | Total | | 21 | 45 | 165 | 231 |

Tabla 2: Tabla de contingencia para los tratamientos funguicidas ensayados, resultados de infección por Sphaeropsis sapinea, hongo inoculado, en las diferentes capas de la semilla.



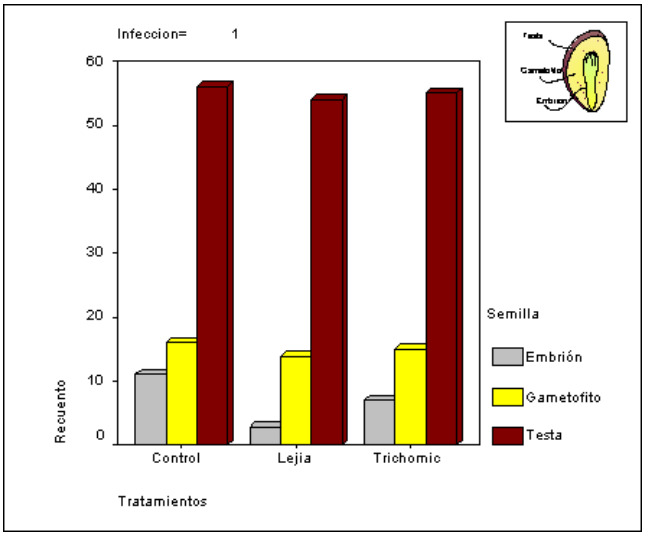




Figura 3 y 4 : Histograma representando el recuento de partes de la semilla con infección por Sphaeropsis sapinea, hongo inoculado, en las diferentes capas de la semilla tratadas con las sustancias ensayadas.

**BIBLIOGRAFÍA**


AITKEN, J & ITURRITXA, E; 2004. Report to MAF-Forest BiosecurityDisease-free import of Pinus seed. Part 1 by Dr Jenny Aitken and Dr Eugenia Iturritxa. The tree Lab. 30 September 2004.

WANG CHEN-GUO, R., 1985. Differences in conidial morphology among isolates of Sphaeropsis sapinea. Plant Disease. 1985. Vol 69. 838-841.

BESNIER, F.;1989. Semillas. Biología y tecnología. Ediciones Mindi-Prensa. Castelló, 37 28001, Madrid 1989.