

ENSAYOS DE PATOGENICIDAD DE *FUSARIUM CIRCINATUM* Nirenberg y O'Donnell EN PLANTAS DE *PINUS RADIATA* D. Don

CARMEN MUÑOZ LOPEZ, MARTA AMPUDIA DÍAZ.

Unidad Docente de Patología Forestal. Departamento de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

Avenida Ramiro de Maeztu s/n 28040 MADRID

Teléfono: 91 336 75 44

e-mail: carmen.munoz.lopez@upm.es

Resumen.

Se han inoculado plantas de 3 savias de *Pinus radiata* con distintos aislamientos de *Fusarium circinatum* (= *Fusarium subglutinans* (Wollenw. et Reinking) Nelson et al. f. sp. *pini* Correll et al.) obtenidos de pies afectados por canchros resinosos. En el ensayo se testa igualmente una cepa de *Fusarium subglutinans* obtenida de maíz. La valoración sobre la patogenicidad de cada aislamiento, teniendo en cuenta las plantas testigo, se realiza siguiendo los criterios propuestos por CORRELL *et al.* (1991), resultando altos niveles de patogenicidad para *Fusarium circinatum* y nulos para *Fusarium subglutinans*, no diferenciables de las plantas testigos. Se aporta información sobre las secuencias sintomatológicas observadas en las plantas a partir de la fecha de la inoculación y se describe la morfología de los aislamientos utilizados, su comportamiento térmico y aspectos de identificación del hongo al microscopio.

Palabras clave: *Fusarium subglutinans*, cancro, inoculación, estenotérmico, polifiálida.

INTRODUCCIÓN

El g. *Fusarium* comprende un elevadísimo número de especies, subespecies, razas, formas especializadas, patotipos etc., cosmopolitas y pleófagas, muchas de las cuales, provocan importantes pérdidas en los cultivos agrícolas de distintos países. Su incidencia ha sido mucho menos importante en el campo forestal. El nº de especies detectadas en la actualidad sobre planta forestal es escaso en comparación con su presencia en la agricultura y cultivos de invernadero, aunque algunas de ellas son muy frecuentes y tienen gran importancia como productoras de marras en viveros forestales, tanto en plántulas preemergentes, como en postemergencia, (“damping-off”) causando podredumbres de las radículas, y estando asociadas también con pudriciones de sistemas radicales, especialmente de coníferas, de 1 y 2 savias (MUÑOZ,1991). Es el caso de *Fusarium moniliforme* Sheldon y *Fusarium oxysporum* Schlecht emend Snyd & Hans. Estas especies, se comportan como hongos patógenos de suelo, estando presentes en las tierras y sustratos empleados en viveros, siendo vehiculizados especialmente por las semillas, provocando daños limitados a las fases juveniles.

En 1945 se identifica en Estados Unidos, *Fusarium lateritium* emend Snyd & Hans f. sp. *pini* como causante de una grave enfermedad, conocida como “Pitch canker” en plantaciones de *Pinus elliotii* var. *elliotii* y *Pinus taeda* (SNYDER *et al.*, 1949), adscripción taxonómica que se mantiene en los trabajos de ARTMAN (1973). La capacidad del género para afectar al arbolado adulto, queda confirmada.

La nomenclatura taxonómica ha sufrido en los últimos años diversos cambios para designar a la misma enfermedad: *Fusarium moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenw & Reink (KUHLMAN *et al.*, 1978) ; *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reink) Nelson et al. f sp. *pini* Correll et al. (CORRELL *et al.*, 1991). Finalmente, NIRENBERG & O'DONNELL, (1998) aportan la última combinación *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell sp. nov.

Desde el punto de vista práctico, y en relación con las especies de *Fusaria* que más frecuentemente se aíslan en especies vegetales forestales, *F. circinatum*, se diferencia de *F. moniliforme*, por la ausencia de producción de microconidios en cadena, formándolos en falsas cabezas, y por la presencia de polifiálidas, y a su vez, difiere en este carácter, y en la ausencia de

clamidosporas, de *Fusarium oxysporum*. Además de la abundante presencia de hifas estériles enrolladas, sin duda, el carácter más sobresaliente como herramienta de identificación en laboratorio, es la formación de polifiálidas, cuya observación debe ser muy meticulosa, para evitar confusiones con las monofiálidas ramificadas, muy frecuentes en los *Fusaria* (Figuras 2 y 3).

Considerado un organismo de cuarentena en Europa, su reciente localización en nuestro país, en puntos del Norte de la Península sobre *Pinus radiata* permite conjeturar, que un nuevo y grave problema se cierne sobre las masas de coníferas españolas, dado la capacidad de este hongo de transmitirse por semilla, pudiéndose convertir en potencial patógeno de diversas especies de pino, entre ellas *Pinus halepensis* y *Pinus canariensis* (CORRELL *et al.*, 1991).

Los síntomas de los pies afectados por el “cancro de la miera” (Pitch canker) son muy variados y a menudo espectaculares. El patógeno afecta prácticamente a todas las estructuras vegetativas y reproductoras del pino, siendo característico el cancro de los troncos y ramas con abundante exudación de resina y el enteamiento de la madera de los árboles adultos. La enfermedad suele comenzar en la fase de vivero, al emplear semillas portadoras del hongo, extraídas de piñas infectadas.

En el presente trabajo, se exponen los resultados y observaciones obtenidas tras las inoculaciones con cepas de distinto origen sobre plantas de *Pinus radiata*, en condiciones de invernadero. Se describen aspectos de las secuencias sintomatológicas externas e internas de los tejidos afectados, y así mismo se aporta información sobre el comportamiento térmico de estos aislados, aspecto que tiene interés de cara a la posible limitación de expansión geográfica por condiciones climáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS

Las cepas se obtuvieron por siembra, tras desinfección, de secciones de cancos resinosos, en medio KOMADA (KOMADA,1975). El estudio de los caracteres más específicos para la identificación de la especie, como la producción de hifas estériles enrolladas y la formación de polifiálidas, se llevó a cabo en medio SNA (NIRENBERG & O`DONNELL, 1998)

Para comprobar el comportamiento de 5 cepas de *Fusarium circinatum* de las cuales 4 se aislaron de cancos resinosos de *Pinus radiata*, 1 fue cedida por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias obtenida de semillas en vivero (BANDERAS *et al.*,2004) y 1 cepa de *Fusarium subglutinans subglutinans* cedida por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, aislada de *Zea mais* y procedente de Illinois (USA) se ha procedido de la siguiente forma en tres ensayos temporalmente espaciados:

CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS DE INOCULACIÓN

ENSAYO 1: Se comenzó el 14 de Mayo de 2002.

Se utilizaron 20 plantas de *Pinus radiata* de 3 savias, procedentes de vivero, que fueron transplantadas a recipientes mayores. Las plantas utilizadas presentaban un buen estado fitosanitario.

De estas 20 plantas, se hicieron 4 bloques de 5 cada uno de ellos.

5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fc-1**, obtenida de cancro resinoso.

5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fc-2**, obtenida de cancro resinoso.

5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fss** (*Fusarium subglutinans subglutinans*), obtenida de *Zea mais*

5 plantas fueron consideradas **Testigos**

ENSAYO 2: Se comenzó el 14 de Octubre de 2002.

Se utilizaron 10 plantas de *Pinus radiata* de 3 savias, procedentes de vivero, que previamente fueron transplantadas a recipientes mayores. Las plantas utilizadas presentaban un buen estado fitosanitario.

De estas 10 plantas, se hicieron 2 bloques de 5 cada uno de ellos.
5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fc-3**, obtenida de cancro resinoso.
5 plantas fueron consideradas **Testigos**.

ENSAYO 3: Se comenzó el 25 de Noviembre de 2004.

Se utilizaron 15 plantas de *Pinus radiata* de 5 savias, procedentes de vivero, que previamente fueron transplantadas a recipientes mayores. Las plantas utilizadas presentaban un buen estado fitosanitario.

De estas 15 plantas, se hicieron 3 bloques de 5 cada uno de ellos.
5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fc-4** obtenida de semilla y cedida por el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado del Asturias.
5 plantas fueron inoculadas con la cepa **Fc-5** obtenida de canchros resinosos.
5 plantas fueron consideradas **Testigos**.

En todos los casos, los bloques se seleccionaron de la forma más homogénea posible, incorporando en todos ellos, plantas con diferente grado de desarrollo.

METODO DE INOCULACION

Se utilizó el propuesto por CORRELL *et al.* (1991). En cada planta se practicó una incisión con un bisturí estéril, portando en la hoja masa de micelio y conidios obtenida por barrido directo de la superficie de la placa con el aislamiento a testar.

La incisión, en sentido longitudinal sobre el brote succulento, a unos 5 cm. del ápice del macroblasto y con un tamaño de 0,5 cm de longitud. Algunas excepciones, que tuvieron consecuencia en los resultados como se pudo posteriormente comprobar, fueron las inoculaciones practicadas en parte del tallo ya lignificado, por ausencia de brotes tiernos en el momento del ensayo. Los testigos fueron heridos de la misma forma, mediante un bisturí estéril. Las zonas de incisión fueron protegidas con papel de parafilm.

VALORACION DE LA PATOGENICIDAD

CORRELL *et al.* (1991), proponen realizar el seguimiento del desarrollo de los síntomas a las 4, 6 y 8 semanas posteriores a la fecha de la inoculación, utilizando como escala de valoración la siguiente:

Nivel 0: Sano, sin necrosis.

Nivel 1: Acículas verdes. Necrosis sólo en el punto de inoculación.

Nivel 2: Acículas verdes. Necrosis superior a 2 cm en las proximidades del punto de inoculación.

Nivel 3: Acículas y / o brotes marchitos, y necrosis anillando el brote.

Nivel 4: Brote anillado y follaje muerto desde el extremo distal al punto de inoculación.

En el presente trabajo se han aplicado los niveles de valoración propuestos por estos autores. Sin embargo, en algunos casos los tiempos de observación se han modificado ligeramente, adaptándolos o bien a una mayor velocidad de observación de síntomas (2 semanas) o por el contrario tras la superación de las 8 semanas.

Tras los ensayos, se obtuvo el reaislamiento de las cepas de cada uno de los canchros provocados artificialmente

COMPORTAMIENTO TÉRMICO

Se han utilizado estufas de cultivo programadas sucesivamente con el siguiente rango de temperaturas: 5° C; 10° C; 15° C; 20° C; 25° C; 30° C; 35° C y 40 ° C. y cultivos de cada una de las cepas en PDA.

Una pastilla de agar y micelio del borde de la colonia, de 6 mm de diámetro obtenida con un sacabocado esterilizado a la llama, se situó en el centro de una placa de Petri con PDA. Por cada aislamiento se realizaron 3 repeticiones y a las 120 horas, se midieron los crecimientos diametrales en mm, según unos ejes de coordenadas trazados por el centro del inóculo.

Se calcularon las medias y desviaciones típicas por cada aislamiento y temperatura considerada.

En el caso de ausencia de crecimiento a determinadas temperaturas (las extremas), los cultivos se depositaron durante 1 semana máximo sobre bancada de laboratorio a temperatura ambiente, con el fin de comprobar, si la temperatura era letal o simplemente había supuesto el cese momentáneo de la actividad miceliar.

RESULTADOS

Con relación a la patogenicidad.

Se expresan en las Tablas del Anexo. Por cada una de las cepas testadas en los tres ensayos realizados se exponen los Niveles obtenidos, a las 4, 6 y 8 semanas, de acuerdo con los criterios propuestos por CORRELL *et al.* (1991). A la vista de los resultados, podemos decir que todas las cepas testadas, a excepción lógicamente de la cepa Fss, cumplen los postulados de Koch

Con relación a la sintomatología.

Externamente, en los casos de evolución más rápida, y aproximadamente a los 15 días de la inoculación, los macroblastos presentan alteraciones llamativas, con cambios de tonalidad de la epidermis hacia un pardo-rojizo constituyendo una banda que progresa inicialmente en sentido ascendente desde el punto de inoculación para después desarrollarse también en sentido descendente, hasta delimitar aproximadamente unos 4 cms de lesión (Figura 6). Paralelamente, el extremo del brote muestra flaccidez, permaneciendo en esta fase las acículas aún verdes (Figura 4).

A las 4 semanas en algunos casos, y en otros a las 6 u 8, se observan las acículas de los brotes inoculados, completamente muertas, con una tonalidad pardo rojiza intensa (Figura 5). El área de inoculación, se encuentra deprimida, con resinosis, y toda la epidermis de la parte superior a la lesión, pardo rojiza. El brote muerto por anillamiento, se rompe con facilidad.

En las inoculaciones practicadas inicialmente sobre tallo leñoso, no se observan tan claramente los cambios de tonalidad de la corteza, si bien hay resinosis y depresiones en la zona de la herida practicada, y finalmente, anillamiento con la consecuente muerte de las acículas situadas por encima.

Internamente, en los cortes transversales practicados a la altura de la inoculación y también por encima de ésta, se observa un "enteamiento" generalizado de los tejidos, y la destrucción de los tejidos primarios de la médula (Figuras 7 y 8), así como extensas alteraciones en el xilema secundario, provocadas por la colonización fúngica vía radios medulares.

En preparaciones microscópicas, se diferencia micelio, fiálidas y microconidios ocupando el parénquima lagunar de la médula y filamentos miceliarios discurriendo a través de los radios medulares, observable tanto en cortes transversales, como tangenciales y radiales.

Por otra parte, las heridas practicadas en los Testigos, y con la inoculación de la cepa Fss, se cerraron perfectamente a los 15 días de la inoculación (Figura 9).

Con relación al comportamiento térmico.

En la Tabla 4 y la Figura 1 puede observarse, que todas las cepas testadas tienen un óptimo de desarrollo a los 25° C, por lo que *Fusarium circinatum* puede considerarse un hongo termotolerante, teniendo por otra parte los puntos cardinales máximos a 30 ° y los mínimos los 10 ° C, por lo que podríamos hablar de una cierta estenotermia

Por otra parte, los 40° C son letales para todas las cepas, mientras que los sometidos a 5° C reinician su desarrollo tras situarlos en bancada de laboratorio a temperatura ambiente

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados son esencialmente coincidentes con los de otros autores. Por una parte se ajustan a los criterios de valoración propuestos por CORRELL *et al.* (1991), si bien en algunos casos, hemos observado niveles 3 y 4 a las dos semanas de la inoculación en primavera, mientras que en otros, los niveles 3 y 4 se han manifestado con posterioridad a las 8 semanas propuestas por estos investigadores, en las inoculaciones practicadas en otoño (cepas Fc4 y Fc5). También coincidimos en la mayor velocidad de producción de canchros en las inoculaciones practicadas en primavera con relación al otoño, abundando en las observaciones anteriores, cuestión que podría tener su origen en la velocidad de propagación del hongo en el interior de los tejidos en asociación con la mayor actividad vascular de las plantas al comienzo del periodo vegetativo. Por otra parte, la influencia de la temperatura en el desarrollo y progresión de la enfermedad en campo, es resaltada por GORDON *et al.* (2001) en relación con los resultados de crecimiento micelial en laboratorio situando el límite mínimo en 9°C. Pero teniendo en cuenta que los 5° C no son letales de acuerdo con nuestros resultados. Finalmente, las inoculaciones practicadas en parte leñosa, tienen mayor dificultad de desarrollo, lo que puede relacionarse con la menor vulnerabilidad de los tejidos. Esto puede indicar que el brote suculento es la parte más susceptible a la enfermedad, y las épocas de máxima infección, la primavera y comienzos del verano. Se han observado variaciones morfológicas y comportamentales entre algunas cepas, probablemente debido a que se traten de genotipos distintos, por lo que en estos momentos se están realizando estudios para su caracterización.

BIBLIOGRAFÍA

ARTMAN, J.D.; 1973. Eastern white pine. A new host for *Fusarium lateritium* F. *pini*. *Plant Dis. Rep.* 57: 182-184.

BANDERAS, E., GARCÍA, P., FERNÁNDEZ, Y., BRAÑA, M. y ARMENGOL, J.; 2004. Detección de *Fusarium circinatum* en *Pinus* spp. en Asturias. *XXI Reunión Anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales Parques y Jardines. Logroño, 9-11 Noviembre de 2004.*

CORRELL, J.C., GORDON, T.R., McCAIN, A.H., KOEHLER, C.S., WOOD, D.L., & SCHULTZ, M.E.; 1991. Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Dis.* 75: 676-682.

GORDON, T.R.; STORER, J.A. & WOOD, D.L.; 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Dis.* 85(11): 1128 - 1139.

KOMADA, H.; 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research.* 8: 114-125.

KUHLMAN, E.G.; DWINELL, L.D.; NELSON, P.E. & BOOTH, C.; 1978. Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia.* 70: 1131-1143.

MUÑOZ, C.; 1991. Estudio de las micosis en viveros de coníferas. Tesis Doctoral . Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. 618 pp.

NIRENBERG, H. ; 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin-Dahlem*. 169 : 1-117.

NIRENBERG, H.I. & O'DONNELL, K.; 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90(3): 434-458.

SNYDER, W.C., TOOLE, E.R., & HEPTING, G.H.; 1949. Fusaria associated with mimosa wilt, sumac wilt, and pine pitch canker of southern pines. *J. Agric. Res.* 78: 365-382.

CEPA	NIVEL 0			NIVEL 1			NIVEL 2			NIVEL 3			NIVEL 4		
	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8
Fss	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fc1	20	20		-	-	-	-	-	-	40	-	-	40	80	100
Fc2	-	-	-	-	-	-	40	-	-	40	20	-	20	80	100
Testigos	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Ensayo 1. Porcentaje de plantas contabilizadas a las 4, 6 y 8 semanas.

CEPA	NIVEL 0			NIVEL 1			NIVEL 2			NIVEL 3			NIVEL 4		
	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8
Fc3	-	-	-	100	40	-	-	60	-	-	-	40	-	-	60
Testigos	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Ensayo 2. Porcentaje de plantas contabilizadas a las 4, 6 y 8 semanas..

CEPA	NIVEL 0			NIVEL 1			NIVEL 2			NIVEL3			NIVEL 4		
	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8	4	6	8
Fc4	60	-	-	40	60	60	-	-	-	-	40	-	-	-	40
Fc5	60	-	-	20	40	20	-	20	20	20	20	20	-	20	40
Testigos	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Ensayo 3. Porcentaje de plantas contabilizadas a las 4, 6 y 8 semanas.

CEPA	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
Fc-1	0 no letal	0.38	1.62	2.3	4.7	1.3	0 no letal	0 letal
Fc-2	0 no letal	0.2	2.98	5.48	7.61	1.9	0 no letal	0 letal
Fc-3	0 no letal	1.02	4.32	6.43	8.2	1.5	0 no letal	0 letal
Fc-4	0 no letal	1.7	4.98	8.13	10.02	3.7	0 no letal	0 no letal
Fc-5	0 no letal	1.15	2.83	4.27	6.57	2.47	0 no letal	0 letal
Fss	0 no letal	0.85	3.55	6.58	8.5	5.1	0 no letal	0 letal

Tabla 4. Tabla de crecimientos medios (mm/día) de las cepas a diferentes temperaturas (°C).

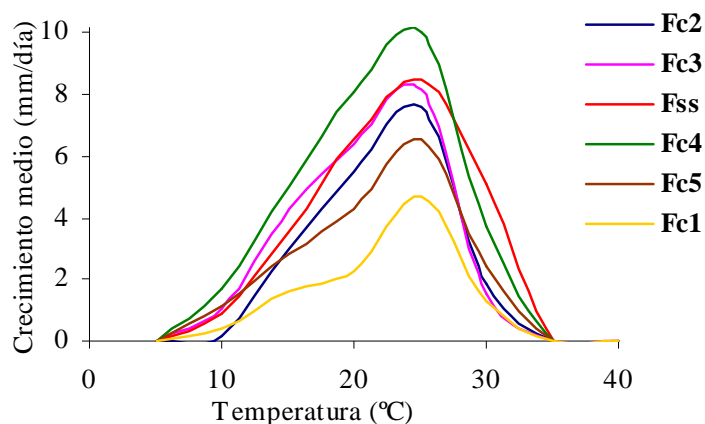


Figura 1. Crecimiento medio (mm/día) de las diferentes cepas en función de la temperatura (°C).

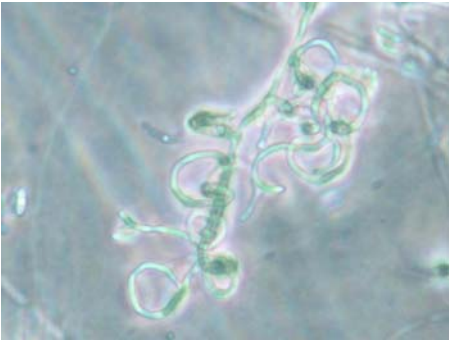


Figura 2. Hifas estériles enrolladas.

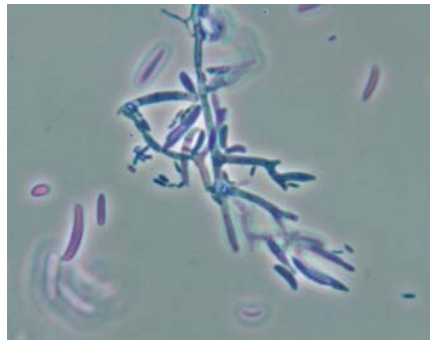


Figura 3. Polifiálidas.



Figura 4. Flaccidez del brote a las dos semanas de la inoculación.



Figura 5. Tonalidad pardo-rojiza del brote muerto.



Figura 6. Necrosis.

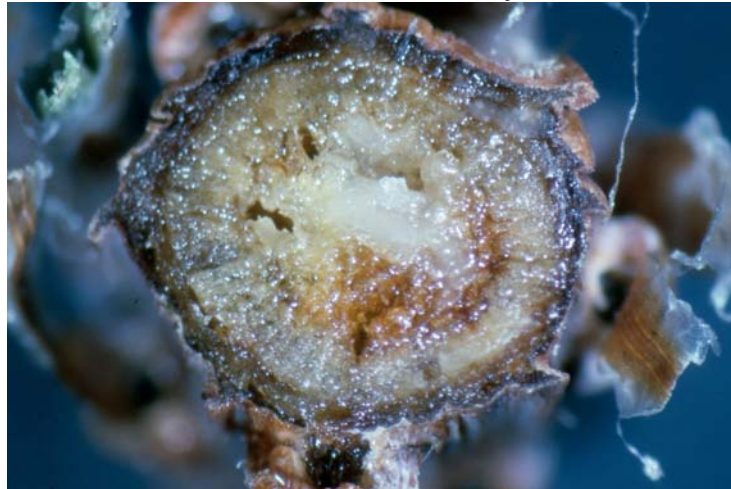


Figura 7. Enteamiento generalizado de los tejidos.



Figura 8. Destrucción de los tejidos de la médula.

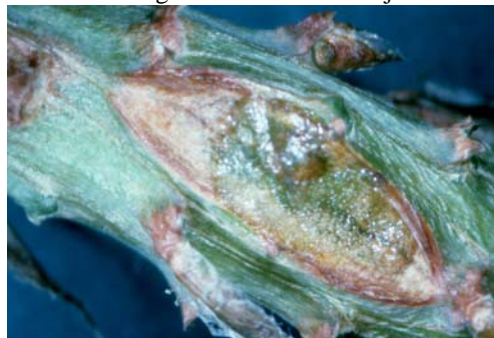


Figura 9. Herida totalmente cicatrizada en un testigo.