

UTILIZACIÓN DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS COMESTIBLES PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium* spp. EN PLANTULAS PARA REFORESTACIÓN. BASES PARA SU APLICACIÓN EN VIVERO.

JAIME OLAIZOLA SUÁREZ; BEATRIZ DE LA PARRA PERAL; PABLO MARTÍN PINTO; JUAN A. PAJARES ALONSO Y JULIO J. DIEZ CASERO .

Entomología y Patología Forestales. Dpto. de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Universidad de Valladolid. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Av./ Madrid 44. 34004. Palencia. E-mail: jdcasero@pvs.uva.es

Resumen

La enfermedad del Damping-off provoca enormes pérdidas en los viveros de planta forestal, afectando especialmente a coníferas. En Castilla y León se ha observado que esta enfermedad está causada principalmente por especies *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme*. Estos hongos generan resistencias al control químico prolongado, por lo que se trabaja en la búsqueda de un método beneficioso e inocuo como el control biológico. Ciertos hongos ectomicorrícicos aportan resistencia a las plántulas al entrar en simbiosis con ellas e incluso antes, debido a la producción de sustancia antibióticas e inhibidoras para otros hongos. Veintiún hongos ectomicorrícicos comestibles fueron aislados y se realizó una evaluación *in vitro* de su capacidad de inhibición en el crecimiento y germinación esporal de varios aislamientos de las dos especies de *Fusarium*. Con los hongos seleccionados *in vitro* se realizó un ensayo de micorrización *in vivo*, en el que se evaluó el efecto de *Fusarium* sobre semillas (preemergencia) y plántulas de 2 meses (postemergencia) de *Pinus sylvestris* y *P. pinea*. Después de 4 meses de la inoculación, se tomaron datos biométricos y porcentaje de micorrización de las plantas. *Rhizopogon roseoulus* y *Lactarius deliciosus* fueron los hongos micorrícicos que mayor protección aportaron.

Palabras clave: damping-off, control biológico, hongos ectomicorrícicos comestibles

INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* incluye a un gran número de especies de hongos, la mayor parte patógenos radiculares, que provocan daños en todo tipo de vegetación a escala mundial (LIDDELL, 1991). En el ámbito forestal, varias de las especies de este género están implicados en la enfermedad del Damping-off (DO), causante de graves pérdidas sobre plántula forestal en viveros, principalmente las especies *F. moniliforme* y *F. oxysporum* (KERSTIN et al., 2002). Los aislamientos aparecen con demasiada frecuencia asociados tanto a plantas sintomáticas como no sintomáticas, lo que plantea dudas sobre su patogenicidad (EDEL et al., 1997). Por otra parte, el control químico de esta patología no esta recomendado por problemas ecológicos y por la resistencia que este hongo presenta (DUMROESE et al., 1991). Sin embargo, el control biológico de hongos ectomicorrícicos, incluido como parte fundamental de programas de manejo integrado, es una alternativa que ha dado buenos resultados con algunas especies no comestibles como *Paxillus involutus*, aunque la gran mayoría de ellas no han sido testadas.

En este trabajo se analizó el posible control del damping-off causado por *Fusarium* spp. mediante hongos ectomicorrícicos comestibles (HEC). Todo ello con la finalidad de conjugar la producción de planta sana y vigorosa para la reforestación con la potenciación de un aprovechamiento forestal cada día más valorado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con la intención de evaluar el potencial antagonista por antibiosis ejercido por los HEC frente a *Fusarium* se evaluó el porcentaje de germinación de las esporas de este patógeno en presencia de los

filtrados de los hongos micorrícicos. Para ello, los HEC se cultivaron en medio líquido durante 15 días, recogiendo tras este periodo el medio de crecimiento del hongo, tras un proceso de filtración ($\varnothing=22\mu\text{m}$) que permitió eliminar las diversas estructuras del hongo. Por otra parte, los aislamientos de *Fusarium* spp. (Fo4P, Fo5P, Fm5P y Fm6P) se cultivaron durante siete días con la intención de conseguir el suficiente número de esporas para los ensayos (10^6 esporas/ml). Las suspensiones de *Fusarium* se pusieron en contacto de forma independiente en un tubo de ensayo con los filtrados de cada uno de los 20 aislamientos de HEC, y se contabilizó el porcentaje de germinación a las 0, 6, 12 y 24 horas (1200 esporas/tratamiento, en 6 replicas de 200).

Con el fin de evaluar el efecto protector de los HEC seleccionados frente al daño producido por *Fusarium* spp. sobre plantas, se realizó un experimento el que se cuantificó la germinación de las semillas en presencia de estos organismos a lo largo de 4 meses. Los datos fueron analizados mediante un análisis GLM de medidas repetidas y un test de comparaciones múltiples de Tukey, con los que se comparó el porcentaje de semillas germinadas respecto al total de las sembradas.

El índice de afección por *Fusarium* spp. en los ensayos de post-emergencia se obtuvo otorgando a las plantas germinadas de cada tratamiento un valor entre 1 y 3, correspondiendo el valor 1 a la planta sana, el 2 a la planta afectada y el 3 a la muerta.

El crecimiento y biomasa de las plántulas de *Pinus* fue evaluado en los ensayos de micorrización, con la intención de conocer el efecto que sobre estas variables ejercieron los aislamientos de *Fusarium* spp. y de los HEC seleccionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de inhibición esporal realizado a las 0 horas permitió corroborar la utilización de conidios sin germinar en los ensayos. Los intervalos de 6 y 12 horas permitieron constatar un incremento continuo en la germinación de las esporas hasta las 24 horas, momento en el que comenzaba a complicarse el conteo por la presencia de gran número de esporas germinadas. De los resultados obtenidos del análisis estadístico en este último periodo, cabe destacar que los filtrados de *Lactarius sanguifluus* (Ls3), *Suillus luteus* (Sl1), *Rhizopogon roseolus* (Rr1), *Leccinum lepidus* (Bl1), *Tricholoma portentosum* (Tp1) y *Xerocomus ferrugineus* (Xf2) inhibieron de forma significativa la germinación de las esporas de la mayor parte de las cepas de *Fusarium*.

Las distintas especies de HEC evaluados mostraron una gran variación en el antagonismo ejercido frente a las cepas de *Fusarium*. Así, frente a hongos con un alto poder inhibitorio como *Lactarius sanguifluus* (Ls3) o *Leccinum lepidus* (Bl1) se observaron varios HEC que no provocaron efecto significativo alguno frente a *Fusarium*. Por otra parte, también las 4 cepas de *Fusarium* respondieron de forma diferente frente a un mismo HEC, de una forma mucho más marcada que en el ensayo anterior. Así por ejemplo, la cepa Ld0 de *Lactarius deliciosus* inhibió la germinación esporal de Fo4P mientras que no lo hizo con el resto de las especies de *Fusarium*, de la misma forma que la cepa Bl4 de *Boletus lepidus* con los aislamientos Fo4P y Fm6P. Cabe destacar el importante efecto inhibitorio causado por los filtrados de cultivos *Agaricus silvicola* (As1) frente a 3 de los 4 *Fusarium* testados, teniendo en cuenta que este hongo fue incluido para observar el comportamiento de un hongo saprofito.

Los resultados expuestos, han permitido conocer como varios de los HEC seleccionados inicialmente por sus características ecológicas y comestibilidad presentaron un claro efecto antagonista *in vitro*, tanto sobre el crecimiento de las colonias, como sobre la germinación esporal de *Fusarium* spp. Estos ensayos han permitido seleccionar para los ensayos *in vivo*, los aislamientos que, con una buena capacidad de micorrización contrastada en la bibliografía, mejores resultados *in vitro* mostraron: *Amanita rubescens*, Ar1; *Boletus fragans*, Bf1; *Laccaria laccata*, Ll1; *Lactarius deliciosus*, Ld1; *Lactarius sanguifluus*, Ls3; *Leccinum lepidus*, Bl1; *Rhizopogon roseolus*, Rr1; *Suillus luteus*, Sl2. No se seleccionaron más cepas por la imposibilidad de la realización de los ensayos *in vivo* dada la ingente disponibilidad de espacio, tiempo y medios que estos ensayos requieren.

Rhizopogon roseolus fue el único HEC que provocó un aumento significativo de la germinación en los tratamientos con *F. moniliforme*, presentando incluso valores de germinación superiores al control sin inocular.

La germinación de las semillas de *P. pinea* inoculadas con *Fusarium oxysporum* se incrementó de forma considerable en los tratamientos con *Lactarius deliciosus* (Ld1). Las variaciones encontradas en los otros tratamientos, con respecto a los controles sin HEC, no fueron significativas.

El grado de afección de las plántulas de *Pinus sylvestris* en los tratamientos con *F. moniliforme* disminuyó de forma significativa en presencia de *L. laccata*, *S. luteus* y *R. roseolus*. Además, los daños causados por *F. oxysporum* sobre esta especie se vieron atenuados por la presencia de *S. luteus*, pese a la ausencia de micorrización este HEC.

En el ensayo con *P. pinea*, solo se observaron diferencias destacables con respecto a los controles sin HEC en los tratamientos con *F. oxysporum* y los hongos *Laccaria laccata* y *Suillus luteus*.

Finalmente, el incremento en biomasa en presencia del HEC, y el decremento en presencia de *Fusarium* fue la pauta general. Sin embargo, en varios de los tratamientos las diferencias no fueron significativas, o la respuesta fue la contraria.

En todos los tratamientos de los ensayos se evaluó y cuantificó el porcentaje de raíces micorrizadas con los HEC inoculados. Este análisis desveló el gran poder de micorrización de *Laccaria laccata* y *Rhizopogon roseolus* sobre *Pinus sylvestris* y *P. pinea*, que superó en gran parte de los tratamientos el 50%. De igual forma, se apreciaron buenos porcentajes para *Lactarius deliciosus* en *Pinus sylvestris* y *Amanita rubescens* en *Quercus ilex*. Por otra parte, en los tratamientos con *Suillus luteus* y *Leccinum lepidus* no pudo encontrarse ningún morfotipo micorrízico identificable como perteneciente a estas especies.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Proyecto de Investigación y Desarrollo AGL2001-1771. Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Prof. D. Valentín Pando (Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Valladolid) por el apoyo prestado en el análisis estadístico de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

- DUMROESE, R.K.; PAGE-DUMROESE, C.V.; WENNY, D.L. 1991. Managing pesticide and fertilizer leaching and runoff in container nursery, pp 27-33. In: Landis, T.D. (Tech. Coord.) , Proceedings: Intermountain Forest Nursery Association; August 12-18 1991; Park City, Utah. Fort Collins, Colorado: USDA For. Serv. Rocky Mt. For. Range Exp. Stn. Gen. Tech. Rep. Rm 211
- EDEL, V.; STEINBERG, G.; GAUTHERON, N.; RECOBERT, G.; ALABOUVETTE, C. 1997. Populations of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. *Phytopathology*, 87:693-697
- LIDDELL, C.M. 1991. Introduction: Recent advances in *Fusarium* systematics. *Phytopathology* 81: 1044-1045
- KERSTIN, S.; BODKER, L.; ROSEDAL, S. 2002. Population structure and pathogenicity of members of the *Fusarium oxysporum* complex isolated from soil and root necrosis of pea. *Microbiol. Ecol.* 42:367-374