

MICOFLORA DE LOS PIÑONES DE *PINUS PINEA* L. EN LA COMUNIDAD AUTONOMA DE MADRID. SU IMPLICACION EN LAS MARRAS DE LOS SEMILLEROS.

C. MUÑOZ LÓPEZ; P. COBOS SUÁREZ; G. MARTÍNEZ SAAVEDRA; C. SOLDEVILLA PUGA; I. MARTÍN SANZ & M. DÍAZ LLORENTE

U.D. ZOOLOGÍA, ENFERMEDADES Y PLAGAS FORESTALES. E. U. ING. TÉCNICA FORESTAL (U.P.M.). C/ RAMIRO DE MAEZTU S/N. 28040 MADRID.

RESUMEN

Las pérdidas de plántulas producidas en vivero, por agentes fúngicos pertenecientes al complejo fitopatológico del "Damping-off", está siendo un problema habitual en dichas instalaciones. El conocimiento de si estos hongos pueden instalarse en las piñas antes de la recolección, fue el objetivo principal del presente trabajo.

La elección de *Pinus pinea* L. fue debida a la importancia económica de su piñón, junto a la presencia de dicha especie en la zona Sur-Oeste de la Comunidad de Madrid.

P.C.: *Pinus pinea*, Piñón, "Damping-off", *Fusarium*.

SUMMARY

The loss of seedlings produced in forest nurseries by micological agents belonging to the phytopathologic complex "Damping-off" is becoming a habitual problem in these installations. To know whether those fungi species can be in the cone before harvesting, was the main objective of the present work.

The choice of *Pinus pinea* L. was due to the economic importance of its seeds, and to the presence of this forest species in the Southwest of the Comunidad Autónoma of Madrid.

K.W.: *Pinus pinea*, Seed, "Damping-off", *Fusarium*.

INTRODUCCION

En los semilleros, la germinación y el posterior desarrollo de las nuevas plántulas va a depender, en gran medida, de la presencia o ausencia de determinados organismos, que pueden atacar a la semilla cuando ésta aún no ha germinado, o durante el proceso de germinación o después de que las jóvenes plántulas emerjan del suelo.

La pérdida que se produce en tales instalaciones, por parte de agentes bióticos, bien sean insectos, bien sean hongos, puede llegar a ser hasta el 100% de la producción.

En la actualidad la C.E.E., fomenta planes y ayudas a la reforestación y mantenimiento de superficies forestales, por lo que la producción de planta en buen estado fitosanitario es imprescindible para la regeneración de los bosques existentes y para la creación de nuevas superficies forestales con distintos fines, ya sean conservacionistas ya sean productivistas.

El mayor responsable de la falta de salud de las plántulas en semilleros, viveros o invernaderos, son las micosis que dan lugar a infecciones que son más conocidas por marras de origen fúngico, o de una forma más universal “Damping-off”, definido por NEERGAARD (1979) de forma precisa como la enfermedad de las semillas y jóvenes plántulas cuyas causas son el decaimiento de la semilla y el colapso del crecimiento en la plántula, usualmente producido por un ataque fúngico.

1.500 organismos sobre semillas de 600 géneros vegetales constituyen el listado de RICHARDSON (1979). Por ello muchas de las especies fúngicas que contaminan las cubiertas seminales pueden infectar los tejidos, pero además algunos de estos hongos pueden causar podredumbres posteriores en las radículas de las jóvenes plántulas.

Si bien la patología de las semillas de especies herbáceas es bastante conocida, existiendo normas internacionales para la detección y comprobación de su grado de sanidad (BESNIER, 1989), la información sobre la micoflora de las semillas forestales es más fragmentaria y no siempre desligada de los estudios sobre el “Damping-off” de plántulas postemergentes. Pero a este respecto hay que señalar en primer lugar las clasificaciones comportamentales de los hongos elaboradas por VANIN y KOTCHKIN (1932) y REES y PHILLIPS (1986).

Según estos autores, hay que distinguir entre una *micoflora externa*, compuesta por un elevado número de géneros con comportamiento esencialmente saprofítico, y otros que son parásitos, actuando sobre la radícula inmediatamente después de la germinación, y una *micoflora interna*, que determina la destrucción del embrión.

En cuanto a la *micoflora externa*, hay que señalar como componentes más frecuentes los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pullularia*, *Trichoderma* y *Trichothecium*. De las especies detectadas en que se ha demostrado su parasitismo aparece *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. merismoides* y *Botrytis cinerea* (REES & PHILLIPS, 1986); *Fusarium moniliforme* (MOTTA, 1986) y *Trichothecium roseum* (MASON & VAN ARSDEL, 1978).

En cuanto a la *micoflora interna* citar *Alternaria alternata* y *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (BARROWS-BROADDUS & DWINELL, 1985).

Cuando los daños se localizan en las pequeñas radículas, hay que considerar otro conjunto de hongos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *P. aphanidermatum* y *P. ultimum* (RATHBUN-GARVATT, 1931; FISHER, 1941) que no se aislan en análisis de semillas (TIMONIN, 1964).

La complejidad de la enfermedad, los diferentes agentes que pueden desencadenarla y los diferentes factores físico-químicos como son temperatura, humedad y pH fundamentalmente, hace necesario revisar y analizar los procesos de producción de la plántula, desde el análisis de la semilla, características medioambientales e higiénicas de las instalaciones, análisis de los sustratos a emplear junto al agua de riego y el análisis de plántulas con síntomas de infección.

Desde 1989 se nos planteó la necesidad de estudiar las micosis en viveros de coníferas analizando material obtenido en diferentes viveros oficiales y particulares sitios en distintas Comunidades Autónomas (MUÑOZ, 1991), junto a otro estudio sobre micosis de coníferas bajo invernadero (SOLDEVILLA, 1995). Tales resultados pusieron de manifiesto que la semilla utilizada se convertía en el primer vector importante de hongos, seguido del suelo que actúa como reservorio, provocando la infección posterior de las jóvenes radículas y desarrollando los síntomas asociados al “Damping-off” (de preemergencia, postemergencia y tardío).

Un aspecto que no se abordó entonces fue el contraste entre la micoflora de semillas en almacén (dos años como media) y los componentes fúngicos del material reproductor en condiciones naturales, desarrollándose en el Proyecto para la C.A.M.(MUÑOZ *et al.*, 1994).

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal utilizado consiste en escamas y piñones de *Pinus pinea*, procedentes de los Términos Municipales y Montes que aparecen en la Tabla 1.. Se optó por tomar lotes de 10 piñas, con 400 piñones tomados al azar para el análisis.

La metodología empleada en el análisis ha sido la siguiente:

a) Preparación de Medios de Cultivo Agarizados. PATATA-DEXTROSA-AGAR (PDA), como medio microbiológico general y MEDIO KOMADA (K), como medio selectivo para *Fusarium oxysporum* y otras especies del género.

b) Apertura de las piñas mediante estufas a 30 °C. y estimación del número total de piñones/piña por conteo. Estimación del estado sanitario aparente de los piñones, mediante observación macroscópica y anotación de cualquier anomalía existente.

c) Siembra de los piñones y escamas en los Medios de Cultivo, previa desinfección en lejía comercial al 10% durante 10 minutos, distribuyendo 5 piñones por cada placa de Petri, y 3 escamas por placa de Petri, sellando con papel parafilm y colocándolas en bancada de laboratorio a temperatura ambiente y en zona estéril.

d) Observación diaria de las placas para la determinación de los micelios aparecidos utilizando claves taxonómicas. Contabilización del número de colonias de cada género y especie, junto al aislamiento, purificación y mantenimiento en micoteca de los distintos hongos purificados. Estimación de los índices de Contaminación y Test de Comprobación basados en contraste bilateral de índices (QUESADA *et al.*, 1982).

e) Test de Patogenia de Cepas de especies fúngicas patógenas capaces de producir necrosis radiculares. Se testaron 11 cepas de *Fusarium moniliforme*, 1 cepa de *F.oxysporum*, 1 cepa de *F. solani* y 1 cepa de *Aureobasidium pullulans*.

RESULTADOS

Ante el análisis macroscópico de piñas y piñones, previo a la siembra en medios de cultivo, se detectó actividad de dos insectos perforadores bien conocidos: el Coleóptero Curculiónido *Pissodes validirostris* Gyll. y el Lepidóptero Pirálido *Dioryctria mendacella* (Stgr.).

Con respecto a la micoflora asociada a piñón y escama se detectó 39 micetes, en un total de 14.169 piñones y 20.161 escamas analizadas, como se expone en la Tabla 2.

Por último los Test de Patogenia dan como resultado que *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* producen necrosis parciales de la radícula, por tanto muerte de la plántula en las todas las cepas testadas, considerándose entonces verdaderos patógenos.

CONCLUSIONES

1) Los hongos identificados, en su conjunto, son típicamente cosmopolitas, ubiquestas y pleópagos. En general, la mayoría de estos micetes se comportan de forma saprofitica o son considerados “habituales contaminadores de la testa”. Sin embargo un exceso de propágulos puede generar trastornos fisiológicos como consecuencia de la competencia por el oxígeno y nutrientes en momentos muy delicados para la semilla. Este listado supone una contribución nueva a la micoflora del *Pinus pinea*.

2) Se observa una clara correlación, salvo pequeñas excepciones, entre las especies fúngicas aisladas en los piñones y las identificadas en las escamas correspondientes de la misma piña.

3) De entre los hongos mencionar a *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea* o *Alternaria alternata* que han demostrado su capacidad para producir podredumbres radiculares. Destacar expresamente a *F. moniliforme* por su abundancia (17.77 % en semilla, 19.16 % en escama) y su capacidad para necrosar y matar plántulas en los ensayos de Patogenia.

4) Se confirma la hipótesis que nos planteamos al inicio del presente Estudio, según la cual la presencia de hongos en frutos y semillas antes de la recolección es un hecho que tiene gran importancia en la utilización posterior de los piñones para la siembra.

Si el piñón actúa como vector de estos hongos, se aumenta considerablemente el riesgo de introducir hongos patógenos en los semilleros. Se debe realizar una selección cuidadosa del material reproductor y se debe desinfectar las semillas antes del almacenaje e inclusive antes de la siembra, para eliminar al máximo la presencia de cualquier inóculo fúngico.

6) La presencia de perforadores, pueden facilitar la penetración de los propágulos fúngicos desde el exterior, a través de los orificios practicados en las piñas, pudiendo ser responsables indirectos de la contaminación en los piñones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BARROWS-BROADDUS, J. & DWINELL, L.D. (1985). Branch dieback and cone and seed infection caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a Loblolly pine seed Orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.

BESNIER, F. (1989). *Semillas, Biología y Tecnología*. Mundi Prensa. Madrid.

FISHER, R. (1941). Germination reduction and radicle decay of conifers caused by certain fungi. *J. Agr. Res.* 62: 87-95.

MASON, G.N. & VAN ARSDEL, E. (1978). Fungi associated with *Pinus taeda* seed development. *Plant Dis.* 62: 864-867.

MOTTA, E. (1986). Champignons pathogènes sur graines forestières. *Bull. OEPP/EPPO* 16: 565-569.

MUÑOZ, C. (1991). *Estudio de las micosis en viveros de coníferas*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

MUÑOZ, C.; COBOS, P.; MARTÍNEZ, G.; SOLDEVILLA, C.; MARTIN, I. & LLORENTE, M. (1994). *Micosis de las semillas de Pinus pinea en la C.A.M.* (no publicado).

NEERGAARD, P. (1979). *Seed Pathology*. Vol I. Mac Millan. London.

QUESADA, V.; ISIDORO, A. & LOPEZ, L.A. (1982). *Cursos y ejercicios de Estadística. Aplicación a las Ciencias Biológicas, Médicas y Sociales*. Alhambra. Madrid.

RATHBUN-GRAVATT, A. (1931). Germination loss of Coniferous seeds due to parasites. *J. Afr. Res.* 42: 71-92.

REES, A.A. & PHILLIPS, D.H. (1986). Detection, Presence and Control of seed-borne Pest and Diseases of Trees with special reference to seeds of tropical and subtropical pines. *Danida Forest Seed Centre, Techn. Rep.* 28: 1-18.

RICHARDSON, M.J. (1979). *An annotated list of seedborne diseases*. Inter. Seed Testing Assoc. Zurich.

SOLDEVILLA, C. (1995). Marras de origen fúngico ("Damping-off") en plantas del género *Pinus sp.* cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas* 21: 87-109.

TIMONIN, M.I. (1964). Interaction of seed-coat mycoflora and soil microorganisms and its effects on preemergence and postemergence of some conifer seedlings. *Canad. J. Microbiol.* 10: 17-32

VANIN, S.J. & KOTCHIN, E.M. (1932). Methods of pathological investigation of the seeds of arboreal species. *Leningr. Bor. Inst. Vred. Selsk. Lesnom. Khoz. Izv.* 2: 285-297.

TERMINO MUNICIPAL	MONTE	Superficie de <i>P. pinea</i>	
ROBLEDO DE CHAVELA	MUP 41 Almenara	62	Has.
ROBLEDO DE CHAVELA	MUP 43 Dehesa Fuenteanguila	100	Has.
ROBLEDO DE CHAVELA	MUP 45 Monte Agudillo	552	Has.
NAVAS DEL REY	MUP 48 Hoyo de la Horca y Solana	285	Has.
NAVAS DEL REY	MUP 49 Cerramesa y Barranco del Fresno	122,25	Has.
NAVAS DEL REY	MUP 50 Pinarejo, Vallefría	1.117	Has.
PELAYOS DE LA PRESA	MUP 52 La Enfermería	80	Has.
SAN MARTIN DE VALDEIGLESIAS	MUP 54 Cerro de S. Esteban, Las Cabreras y Valle Lorenzo	1.158	Has.
SAN MARTIN DE VALDEIGLESIAS	MUP 55 Navapozas, Fuenfría, Valdeyerno y Valcaliente	560	Has.
GALAPAGAR	MC M-3042 Matamora	225	Has.
GALAPAGAR	MC M-3044 Camino Viejo	32	Has.
GALAPAGAR	MC M-3045 Las Cuestas	12	Has.
GALAPAGAR	MC M-3051 Las Regaderas	159	Has.
GALAPAGAR	MC M-3052 Vinatea	324	Has.
GALAPAGAR	MC M-3053 Las Ventillas	287	Has.
GALAPAGAR	MC M-3088 Cuesta Blanca	63	Has.
VALDEMORILLO	MC M-3092 Cuerda Herrera	212	Has.
CADALSO de los VIDRIOS	MUP 47 Pinar del Concejo	466	Has.
CENICIENTOS	MUP 51 Albercas y Alberquillas	159	Has.
VILLA DEL PRADO	MUP 56 Cuartel del Norte	199	Has.
NAVALCARNERO	MC M-2016	299	Has.
VILLAVICIOSA DE ODON	MC M-2007 Bacares	198	Has.

MUP: Monte de Utilidad Pública **MC:** Monte Consorciado

Tabla 1. Relación de Términos Municipales, Montes y Superficie en Hectáreas de *P. pinea*.

ESPECIE FUNGICA	% COL Piñones	% COL Escamas	COL. Piñones	COL. Escamas
<i>Acremonium sp.</i> Link. ex Fr.	0.23	0.20	32	41
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) Keissler	7.31	8.64	1.036	1.741
<i>Aspergillus niger</i> V. Tieghem	13.91	12.24	1.971	2.468
<i>Aspergillus sp.</i> Micheli ex Link	4.46	4.70	632	947
<i>Aureobasidium pullulans</i> (De Bary) Arnaud	4.56	7.17	646	1.445
<i>Bipolaris sp.</i> Schoemaker	0.03	-	4	-
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Nocca Balb	0.61	0.55	87	111
<i>Cephalosporium sp.</i> Corda	2.01	1.57	285	316
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers: Fr.) Link	2.66	1.25	377	253
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.	0.23	0.24	33	48
<i>Chaetomium montblancense</i> Guarro, Calvo y Ramírez	0.04	0.01	5	2
<i>Cylindrocarpon destructans</i> (Zinss.) Scholten	0.01	-	1	-
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	0.08	0.06	12	13
<i>Fusarium sp.</i> Link.: Fr.	0.88	0.95	124	191
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	0.15	0.22	21	44
<i>Fusarium merismoides</i> Corda	0.08	0.09	12	18
<i>Fusarium moniliforme</i> (Sheldon)em. Snyd,Hans	17.77	19.16	2.518	3.863
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlech. em. Snyd, Hans	1.03	0.57	146	115
<i>Fusarium roseum</i> Link em. Snyd, Hans	1.54	1.55	218	312
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Appel, Wollenb.	6.58	5.18	932	1.044
<i>Gliocladium roseum</i> (Link) Bainier	0.01	0.01	2	2
<i>Hypoxylon sp.</i> Bull.: Fr.	0.06	0.21	8	43
<i>Monilia sp.</i> Bonorden	0.69	0.77	98	156
<i>Mucor mucedo</i> Fr.	0.02	0.16	3	32
<i>Nodulisporium sp.</i> Preuss	0.80	0.99	113	200
<i>Paecylomices variotii</i> Bainier	0.16	0.05	22	11
<i>Papulaspora sp.</i> Preuss	0.04	0.02	6	4
<i>Penicillium sp.</i> Link	18.33	19.24	2.597	3.878
<i>Pestalotiopsis funerea</i> (Desm.) Stey	0.04	0.01	5	2
<i>Phoma sp.</i> Sacc.	0.01	0.04	2	8
<i>Rhinocladiella sp.</i> Nannfeldt	0.01	-	1	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex Fr.) Vuill.	2.56	2.47	363	498
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	0.14	0.13	20	26
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.	0.64	0.88	90	177
<i>Torula sp.</i> Pers.	0.15	0.12	21	25
<i>Trichoderma viride</i> Pers.: Fr.	4.43	3.67	627	739
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.:Fr.) Link	7.26	5.99	1.029	1.207
<i>Ulocladium sp.</i> Preuss	0.42	0.88	60	180
<i>Virgariella atra</i> Hughes	0.07	0.01	10	1

% COL Piñones: Porcentaje de colonias % COL Escamas: Porcentaje de colonias
COL. Piñones: Colonias fúngicas en piñón COL. Escamas: Colonias fúngicas en escama

Tabla 2. Relación de especies fúngicas, porcentaje y nº de colonias en piñón y escama.