

## PRESENCIA DE ESPECIES DE *FUSARIUM* SOBRE SEMILLAS DE *PINUS* SPP. EN GALICIA

GONZÁLEZ, B.<sup>1</sup>; PINTOS, C.<sup>1</sup>; MANSILLA, J. P.<sup>1,2</sup>; AGUÍN, O.<sup>1</sup> y PÉREZ, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Fitopatológica do Areeiro. Diputación de Pontevedra. Subida a la Robleda, s/n, 36153 Pontevedra [efa@efa-dip.org](mailto:efa@efa-dip.org)

<sup>2</sup> Dpto. de Producción Vexetal. Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario. 27002 Lugo

Palabras clave: *Fusarium circinatum*, *F. verticillioides*, *Fusarium proliferatum*.

**Resumen:** A finales de 2004 la Estación Fitopatológica do Areeiro (EFA) detectó, por primera vez en Galicia, la presencia de *Fusarium circinatum*, patógeno de cuarentena de la lista A2 de la EPPO, sobre semillas y plántulas de vivero de *Pinus* spp. Como consecuencia de ello la EFA, con la colaboración de la Dirección Xeral de Montes e Industrias Forestais de la Xunta de Galicia, decide realizar un muestreo exhaustivo de *Pinus* spp. en sequeros, viveros y plantaciones establecidas, recogiendo diferentes tipos de material vegetal – semillas, plántulas de vivero, madera de chancros resinosos, flores y piñas- para conocer la distribución y expansión del hongo en la comunidad autónoma gallega. En este trabajo exponemos los resultados parciales de este muestreo, centrándonos en los análisis de 372 muestras de semillas -139 lotes procedentes de sequeros y huertos semilleros y 233 procedentes de piñas de árboles adultos- de *Pinus pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris*, detectándose la presencia de *F. circinatum* en un 40% de las muestras así como otras especies de *Fusarium*, destacando entre ellas *Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides*. En este trabajo se citan las especies de *Fusarium* aparecidas, y su grado de incidencia en las semillas de las diferentes especies de pino analizadas.

### INTRODUCCIÓN

Dentro de los hongos fitopatógenos el género *Fusarium* infecta un espectro de tejidos vegetales y plantas muy amplio, que incluye tejidos radiculares, vasculares y reproductores de plantas hortícolas, ornamentales, forestales, etc., de diferentes hábitats del mundo, ocasionando muchas veces pérdidas económicas importantes.

En el grupo de las coníferas, y en concreto en el género *Pinus*, debe prestarse atención a la presencia de *Fusarium circinatum*, notificado por primera en los años 80 en EEUU, presente en países no europeos como Chile, Haití, Irak, Japón, México y Suráfrica (EPPO-2006), y reconocido actualmente en Europa como organismo de cuarentena perteneciente a la lista A2 de la EPPO. En España ya está presente en la zona Norte (LANDERAS et al., 2005; PÉREZ-SIERRA et al., 2007) incluyendo Galicia (PINTOS et al., 2006). Este hongo, que ocasiona la enfermedad conocida como “*pitch canker*” en los pinos, tiene la capacidad de infectar, durante todas las estaciones del año, estructuras vegetativas y reproductivas en diferentes estados de madurez, lo que ocasiona mortalidad de flores femeninas y piñas maduras, deterioro de semillas, y debilitamiento y muerte de plántulas y árboles jóvenes y adultos (DWINELL et al., 2002).

Además, existen otras especies del género, entre las que cabe destacar *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, que no siendo especies de cuarentena sí pueden causar daños importantes en semillas y plántulas de pino cultivadas en viveros forestales (SOLDEVILLA, 1995; MANSILLA-VÁZQUEZ et al., 1998). La presencia de *F. proliferatum* se ha observado también sobre semillas de *Picea abies* (MOTTA et al., 1996), y se ha reconocido como patogénico en cultivos como el espárrago (ELMER, 2002).

La presencia de estos hongos en las semillas de pino puede contribuir a su dispersión geográfica y mantenimiento en zonas contaminadas, por lo que parece aconsejable la detección del inóculo fúngico sobre semillas.

El objetivo de este trabajo, perteneciente a otro más extenso, fue determinar mediante métodos de laboratorio rutinarios el estado fitosanitario, respecto al género *Fusarium*, de las semillas de *Pinus pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* muestreados en Galicia.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Muestreo**

La Estación Fitopatológica do Areeiro (EFA) perteneciente a la Excma. Diputación de Pontevedra detectó la presencia de *F. circinatum* por primera vez en Galicia en el año 2004 sobre plántulas de vivero y semillas de pino, planteando la necesidad de realizar muestreos exhaustivos propios y en colaboración con la Dirección Xeral de Montes e Industrias Forestais de la Xunta de Galicia, de *Pinus* spp. en sequeros, viveros y plantaciones establecidas, recogiendo diferentes tipos de material vegetal – semillas, plántulas de vivero, madera de chancros resinosos, flores y piñas- para conocer la distribución y expansión de *F. circinatum* en la comunidad autónoma gallega.

En el diseño y planificación de los muestreos propuestos se tuvo en cuenta que la distribución geográfica de *F. circinatum* parecía encajar con una distribución asociada al hospedador y reforzada por una distribución antropogénica a través de las actividades forestales de viveros y maderistas.

El muestreo exhaustivo realizado por la EFA en 2006 se ejecutó trazando sobre la superficie cartográfica de la provincia de Pontevedra cuadrículas de 5x5 km (PINTOS *et al.*, 2006). En las cuadrículas que tuviesen masas de árboles adultos de *Pinus pinaster* y *P. radiata* en monte se recogió el material vegetal, consistente en partes leñosas de tronco y ramas con chancros resinosos, flores y piñas inmaduras y maduras con sus respectivas semillas en crecimiento o ya formadas.

La D.X. de Montes de la Xunta, en colaboración con la EFA, incluyó en su muestreo del año 2006 puntos de las cuatro provincias gallegas, que tuviesen masas de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* en monte, así como muestras recogidas en huertos semilleros, sequeros y viveros tomándose como material vegetal piñas en diferente estadio de maduración, semillas maduras envasadas procedentes del sequero y plántulas de vivero, respectivamente.

Este muestreo que permitía conocer la distribución de *F. circinatum* se aprovechó para detectar la presencia de otras especies de *Fusarium* en semillas de pinos de Galicia.

### **2. Material analizado**

De todo el material vegetal recogido y procesado, en este trabajo sólo se presentan los datos referidos a las semillas, de modo que el material analizado consistió en semillas maduras ya envasadas, procedentes de sequero, o semillas procedentes de piñas inmaduras o maduras, de monte o del huerto semillero, de *Pinus pinaster* o *P. radiata* o *P. sylvestris*, de las provincias de A Coruña, Lugo, Ourense o Pontevedra, y de los muestreos realizados sólo por la EFA (EFA) o por la Xunta en colaboración con la EFA (XUNTA-EFA).

El muestreo de la EFA aportó 102 lotes de semillas procedentes de piñas de árboles adultos de *P. pinaster* y *P. radiata* recogidos en el exhaustivo muestreo realizado en cuadrículas de 5X5 km en la provincia de Pontevedra. La Xunta aportó 270 lotes de semillas, de los cuales 131 procedían de piñas de árboles adultos de *P. pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* de monte en Galicia, y 139 lotes procedían del huerto semillero y del sequero de A Coruña. En total se analizaron 372 lotes de semillas, de los cuales 233 lotes procedían de piñas de árboles adultos en monte, y 139 procedían del huerto semillero y del sequero.

Los lotes de semillas extraídas de piñas se obtenían de un mínimo de 25 piñas de cada punto de muestreo para extraer un mínimo de 100 semillas, y los lotes de semillas maduras envasadas del sequero consistían en una cantidad superior a 500 semillas.

### **3. Protocolos y medios de cultivo utilizados**

#### *3.1. Extracción de semillas a partir de piñas*

Las piñas maduras, se dejaban a T<sup>a</sup> ambiente durante 12 h, tras lo cual se sacudían y se recogían las semillas.

En las piñas inmaduras, en su mayoría cerradas, se forzó la expulsión de las semillas sometiéndolas a una T<sup>a</sup> de 40 °C en estufa de aire forzado durante 12 h. Se prefirió el tiempo prolongado a temperatura media para no dañar las semillas ni el inóculo potencial en las mismas. Si tras el calentamiento la piña no soltaba las semillas se troceaba longitudinal y transversalmente para sacar las semillas insertas con unas pinzas.

#### *3.2. Siembra de semillas en medios de cultivo*

Las semillas utilizadas en este trabajo no sufrieron ningún tipo de esterilización antes de su siembra, para poder detectar tanto los hongos superficiales como los del interior. El estudio consistió en el análisis de las semillas sobre placas de agar para estudiar su micoflora respecto al género *Fusarium*.

Se procesaron 100 semillas de cada lote, de modo que fuese un número representativo del lote y a la vez manejable en laboratorio. Se utilizó la siguiente metodología: 1) Siembra de 100 semillas de cada lote a razón de 10 semillas por placa, en medio de cultivo K (KOMADA, 1975), selectivo para *Fusarium*; 2) Incubación de las placas en oscuridad a 25 °C, durante 4 semanas, observándose periódicamente y repicando las colonias de *Fusarium* que apareciesen; 3) Obtención de cultivos monospóricos de las colonias de *Fusarium*; 4) Repicado de cada cultivo monospórico a medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar); 5) Incubación de las placas a 25 °C en oscuridad durante 10 días; 6) Identificación morfológica de las especies de *Fusarium*.

#### *3.3. Identificación molecular*

La identificación morfológica de *F. circinatum* se reforzó con la identificación molecular, según la metodología propuesta en el RD 637/2007, que implicaba los pasos: a) Extracción de ADN de los cultivos monospóricos morfológicamente sospechosos, b) Realización de protocolo de PCR (SCHWEIGKOFER et al., 2004) con los cebadores CIRC1A y CIRC4A, obteniéndose un fragmento de 360 pb en caso positivo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La evaluación de los cultivos monospóricos sobre las semillas de *Pinus pinaster*, *P. radiata* y *P. sylvestris* de este estudio mostró la presencia de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell emend. Britz, Coutinho, Wingfield & Marasas, *Fusarium proliferatum* (Matssushima) Nirenberg, *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Zinder & Hansen, y *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Zinder & Hansen, lo cual, concuerda con otros trabajos donde la presencia de diferentes especies del género *Fusarium* sobre semillas de distintos pinos es un hecho constatado (PAWUK, 1978; MARÍN et al., 2006).

Los cultivos monospóricos arriba citados se diferenciaron morfológicamente entre ellos por la combinación de varios rasgos. *Fusarium circinatum* forma microconidias aisladas o en falsas cabezas, que surgen de monofiálidas y polifiálidas dando aspecto de “arbolillos” al crecimiento micelial; y con el tiempo desarrolla circinos, esto es, hifas estériles tabicadas y curvadas que tienden a enroscarse; además no presenta clamidosporas. *Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides* forman sus microconidios sobre todo en cadenas y menos en falsas cabezas, lo cual las diferencia de *F. circinatum*, distinguiéndose entre ellos por la presencia de polifiálidas y monofiálidas en *F. proliferatum* y sólo monofiálidas y cadenas de

microconidios más largas en *F. verticillioides*. *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, presentan microconidios aislados, sólo sobre monofílicas, con fílicas muy pequeñas y ligeramente abombadas el primero y muy largas y finas el segundo (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

En el caso de *F. circinatum* la identificación morfológica y por técnicas moleculares (PCR) coincidió en el 100% de los casos.

Cuantitativamente del material vegetal recogido en monte (233 lotes-100%) y del recogido en el sequero (139 lotes-100%), se observó ausencia total de *Fusarium* en 77 lotes (33%) y 80 lotes (57,5%), y se detectó presencia de al menos alguna de las especies de *Fusarium* citadas en 156 lotes (67%) y 59 lotes (42,5%) (Tabla 1.)

De las cinco especies de *Fusarium* detectadas sobre las semillas procedentes de monte o de sequero, la especie predominante fue *F. circinatum* presente en 104 lotes (45%) y 45 lotes (32%) respectivamente; seguido de *F. proliferatum* con 54 lotes (23%) y 11(8%) y *F. verticillioides* en 23 lotes (10%) y 10 lotes (7%); y los dos minoritarios *F. oxysporum* en 3 lotes (1%) y 2 lotes (1%), y *F. solani* con 2 lotes (1%) en monte y la misma cantidad y porcentaje en sequero. Esta mayor presencia de *F. circinatum* podría estar relacionada con su capacidad para infectar material vegetal vegetativo y reproductivo en plantas de diferentes edades, con lo que su dispersión se podría ver muy aumentada respecto a las otras especies. (Figura 1).

Tanto los lotes procedentes de monte como de sequero mostraron en su mayoría una única especie por lote. Sin embargo, también hubo casos de combinaciones de 2 o 3 especies de *Fusarium* en el mismo lote y creciendo en la misma placa de cultivo, pero con desarrollo micelial a partir de semillas diferentes dentro de la misma placa. Así, del material recogido en monte y del recogido en sequero hubo con presencia de una sola especie de *Fusarium* 127 lotes (54,5%) y 51 lotes (36,5%), en combinaciones dobles hubo 28 lotes (12%) y 5 lotes (4%), y en combinaciones triples hubo 1 lote (0,5%) y 3 lotes (2%), respectivamente. La detección de solo una especie de *Fusarium* por lote podría indicar una predominancia ecológica de unas especies sobre otras en términos de mayor velocidad de crecimiento, pero esta hipótesis requiere más estudios. (Tabla 1)

Tanto en material de monte como de sequero *F. circinatum* aparecía como única especie en 81 lotes (35%) y 37 lotes (27%), *F. proliferatum* en 33 lotes (14%) y 7 lotes (5%), *F. verticillioides* en 10 lotes (4%) y 5 lotes (4%), *F. oxysporum* en 3 lotes (1%) y ningún lote, y *F. solani* en 1 lote (0,5%) y 2 lotes (1%), respectivamente. En muchos de los casos donde *F. proliferatum* o *F. verticillioides* aparecían como única especie de *Fusarium* del lote, el número de semillas por placa colonizado por alguno de ellos solía ser elevado o total (10 semillas en cada placa), lo cual implica un inóculo potencial muy alto que debe ser considerado en caso de usar estas semillas.

El grado de madurez de las piñas, es decir, que fuesen inmaduras (cerradas) y maduras (abiertas) no afectó a la detección de los *Fusarium*, especialmente a la detección de *F. circinatum*, explicado por su capacidad para afectar tejidos en distintos estados de madurez.

Las semillas de *P. pinaster* y *P. radiata* mostraron presencia de todas las especies de *Fusarium* detectadas, especialmente de *F. circinatum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, lo cual indica susceptibilidad de las especies *P. pinaster* y *P. radiata* a estos hongos, y la capacidad de sus semillas como medio transmisor de estos hongos. En ensayos anteriores realizados por la EFA se había detectado *F. verticillioides* sobre *P. pinaster* y *P. radiata*, viendo que con ensayos de patogenicidad las semillas de *P. pinaster* son más sensibles en preemergencia al ataque de *F. verticillioides* que las de *P. radiata*; sin embargo, una vez germinadas se muestran más tolerantes al ataque de post-emergencia (MANSILLA et al., 1998). Sería interesante ampliar los estudios de patogenicidad de *F. circinatum* y *F. proliferatum* sobre estas dos especies de pino.

En *P. sylvestris* sólo se detectó presencia de *F. proliferatum*, aunque este resultado debe tomarse con cuidado porque el número de lotes procedentes de esta especie fue mucho menor que los procedentes de *P. pinaster* y *P. radiata*. Quizás esta ausencia de otras especies de *Fusarium* –entre ellas *F. circinatum*–, sea una cuestión meramente aleatoria y no de menor sensibilidad de *P. sylvestris* hacia estos hongos, aunque otros autores (PÉREZ-SIERRA et al., 2007) respecto a *F. circinatum* encontraron menos aislados en *P. sylvestris* que en *P. radiata*, *P. pinaster* o *P. nigra*.

En resumen, se puede decir en las semillas del material recogido (piñas) en monte y en sequero en Galicia se ha detectado un estado fitosanitario inadecuado, con presencia de varias especies de *Fusarium*, una de ellas de cuarentena en Europa. *Fusarium circinatum* fue la especie más detectada en los lotes; *F. proliferatum* aparece también en gran cantidad de lotes y con mucha presencia en cada lote; y *F. verticillioides* está en número suficiente de lotes para tener cuidado con su uso en vivero.

### Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección Xeral de Montes e Industrias Forestais de la Xunta de Galicia la recogida y el envío de muestras para su análisis así como a Dña. Ana García Servia, técnico de salud ambiental de la EFA, su ardua y eficaz labor en el manejo de las muestras.

### BIBLIOGRAFÍA

- DWINELL, D.; FRAEDRICH, S. W. & ADAMS, D.; 2002. Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. In: B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden & L. W. Burgess (eds.), *Fusarium, Paul E. Nelson Memorial Symposium*: 225-232. APS Press. Minnesota.
- ELMER, W. H.; 2002. *Fusarium* diseases of asparagus. In: B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden & L. W. Burgess (eds.), *Fusarium, Paul E. Nelson Memorial Symposium*: 248-262. APS Press. Minnesota.
- KOMADA, H.; 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Protect. Res.* 8: 114-125.
- LANDERAS, E.; GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ, Y.; BRAÑA, M.; FERNÁNDEZ-ALONSO, O.; MÉNDEZ-LODOS, S.; PÉREZ-SIERRA, A.; LEÓN, M.; ABAD-CAMPOS, P.; BERBEGAL, M.; BELTRÁN, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. & ARMENGOL, J. 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant disease* 88:1015.
- LESLIE, J. F. & SUMMERELL, B. A.; 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. USA.
- MANSILLA VÁZQUEZ, J. P.; PINTOS VARELA, C.; SÁINZ OSÉS, M. J. Y VILARIÑO, A.; 1998. *Fusarium moniliforme* Sheldon sobre *Pinus* spp.: ensayos de patogenicidad. En: Sociedad Española de Fitopatología, *Actas del IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. 223. Salamanca 1998
- MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; VÁZQUEZ, C. & SANCHIS, V.; 2007. Contamination of pine nuts by fumonisin produced by strains of *Fusarium proliferatum* isolated from *Pinus pinea*. *Letters in Applied Microbiology* 44: 68-72.
- MOTTA, E.; ANNESI, T. & BALMAS, V.; 1996. Seedborne fungi in Norway spruce: testing methods and pathogen control by seed dressing. *Eur. J. For. Path.* 26: 307-314.
- PAWUK, W. H.; 1978. Damping-off of container-grown longleaf pine seedlings by seedborne fusaria. *Plant Disease Reporter*. 62: 82-84.

- PÉREZ-SIERRA, A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. & ARMENGOL, J. 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* 111: 832-839.
- PINTOS, C.; AGUÍN, O.; PÉREZ, R.; MANSILLA, J. P.; GONZÁLEZ, B. Y MONTENECRO, D.; 2006. Caracterización de la población actual de *Fusarium circinatum* sobre masas de *Pinus* spp. en la provincia de Pontevedra. *En: Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Actas del XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. 208. Murcia 2006.
- RD 637/2006, DE 26 DE MAYO, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell. Ministerio de Agricultura. BOE nº 107 de 9 de junio de 2006.
- SCHWEIGKOFER, W.; O'DONNELL, K. & GARBELOTTO, M.; 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agente of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3512-3520.
- 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.

Tabla 1: Número y porcentajes de lotes con presencia/ausencia de *Fusarium* según el origen del material.

	Monte	Sequero
<b>Número y porcentaje (%) de lotes sin <i>Fusarium</i></b>	77 (33%)	80 (57,5%)
<b>Número y porcentaje (%) de lotes con <i>Fusarium</i></b>	156(67%)	59 (42,5%)
Número y porcentaje de presencia de 1 sola especie	127 (54,5%)	51(36,5%)
Número y porcentaje de presencia de 2 especie	28 (12%)	5 (4%)
Número y porcentaje de presencia de 3 especie	1 (0,5%)	3 (2%)
<b>Número y porcentaje (%) total de lotes según el origen del material</b>	233 (100%)	139 (100%)

Figura 1: Presencia de las especies de *Fusarium* en los lotes.

