

Determinación de la capacidad parasitaria de la Microbiota fúngica y de sus extractos acuosos en las semillas del cardo (*Cynara cardunculus* L.)

D. PALMERO, C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†)

El presente estudio evalúa el efecto que 6 diferentes géneros hongos aislados a partir de semillas de 54 diferentes cultivares de cardo (*Cynara cardunculus* L.) y sus extractos acuosos tienen sobre la germinación y nascencia de las semillas. Se han realizado pruebas de patogenicidad con dos aislados de cada uno de los seis géneros de mayor frecuencia del inventario (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Alternaria*), así como de los extractos producidos tras 3, 7 y 11 días de incubación de los micetos.

Los resultados de las inoculaciones con los micetos muestran efectos negativos sobre los porcentajes de germinación, con reducciones en la germinación que fueron máximas tras las inoculaciones con *Rhizopus stolonifer* (29% de disminución) y *Fusarium verticillioides* (23%). Los porcentajes de emergencia disminuyen tras duplicar la concentración del inóculo, aumentando además drásticamente el número de plántulas dañadas sobre el total de las emergidas. En el significativo caso de la inoculación con *Cladosporium* la duplicación del inóculo disminuyó la germinación hasta en un 31% respecto al testigo.

Las plántulas emergidas tras las inoculaciones con los extractos obtenidos a partir de cultivos líquidos de los hongos ensayados presentaban los mismos síntomas de atrofia y daños sobre raíz y coleóptilo que los descritos para cada hongo. Los extractos acuosos de los géneros estudiados disminuyen también la germinación. Los resultados nos muestran la diferente capacidad parasitaria de cada una de las especies estudiadas apreciándose además diferencias según los diferentes periodos de agitación de los hongos y permiten asegurar que la producción de toxinas está regulada por el hongo, y que no aumenta linealmente con el crecimiento micelial.

D. PALMERO: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Dirección Técnica de Evaluación de Variedades y Laboratorios, Ctra. de la Coruña Km. 7,5 (28400) Madrid (persona de contacto email: palmero@inia.es)

C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†): U.D. Genética y Fitopatología. E.U.I.T.A. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28400 Madrid.

Palabras clave: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer*, metabolitos, toxicidad, patogenicidad, plántulas.

INTRODUCCIÓN

En su estudio sobre la producción de biomasa en el sur de Europa, TREBBI (1993) estudió, entre otras especies vegetales, la productividad de *Cynara cardunculus*. El

autor obtuvo rendimientos de 69 y 57 toneladas por hectárea de los cultivares B. de España y G. de Roma respectivamente. En otros estudios realizados sobre cardo se recogen diferencias de rendimientos de hasta 7 toneladas por hectárea de biomasa

total en función de año de cosecha (FOTTI *et al.*, 1999).

Estas diferencias pueden, en parte, explicarse por las enfermedades que afectan al cultivo y que tienen un importante efecto sobre el rendimiento final del mismo.

Una de las ventajas del cultivo de *Cynara* son las escasas labores culturales que demanda. Sus bajos requerimientos hídricos y de fertilización hacen que su cultivo sea viable en zonas de baja pluviometría. Los tratamientos fungicidas son, por tanto, costes que no podría soportar este tipo de cultivos. Esto, unido al coste medioambiental de su uso, nos hacen plantearnos la lucha contra las enfermedades desde otras perspectivas.

El presente trabajo pretende, una vez conocida la micoflora presente en las semillas del cardo, averiguar cual es el efecto que los micetos "per se" y los metabolitos exudados tienen sobre la germinación y la nascencia de las semillas, continuando con otro artículo publicado con anterioridad, donde se hacía el inventario de la microbiota fúngica asociada a las semillas de cardo (PALMERO *et al.*, 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados fúngicos

Los hongos estudiados proceden de un inventario fúngico de las semillas de cardo (*Cynara cardunculus* L.), donde se analizaron más de 4400 semillas de 54 cultivares de cardo de distintas procedencias y se identificaron un total de 15 géneros diferentes. (PALMERO *et al.*, 2005).

Tanto en los ensayos de germinación como en los de patogenicidad, se utilizaron semillas procedentes de San Fernando de Henares, proporcionadas por la U.D. de Botánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, conservadas en cámara climática, en sacos de semillas no tratadas, a 4 °C. Los géneros de hongos seleccionados para este estudio fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Alternaria*.

Método utilizado en el conteo de conidios

Para determinar la concentración del inóculo aplicado a las semillas, se utilizó un hematocitómetro con retículo de 0.200 mm de profundidad por 5 mm² de superficie. (Retículo de Malassez. FORTUNA. W-GERMANY®).

Determinación del poder germinativo de las semillas.

Para la realización de los ensayos de germinación se utilizaron 10 placas de Petri de vidrio de 90 mm de diámetro a modo de cámara húmeda en cada repetición (20 semillas por placa) y ensayos sobre toallas de papel de filtro humedecidote 52 x 42 cm con 50 semillas/toalla y dos repeticiones por cada uno de los cuatro tratamientos ensayados: dos con hipoclorito sódico sin diluir (40 g de Cl activo / l) usando 5 y 10 minutos como tiempo de inmersión, con posterior aclarado con agua del grifo. Dos con diluciones de hipoclorito sódico al 50 % (20 g de Cl activo / l) utilizando los mismos tiempos que para el caso anterior, y el testigo.

Las pruebas de germinación realizadas sobre sustrato se llevaron a cabo en recipientes de plástico con un tamaño de 90x113 mm de boca y 63 mm de profundidad y con orificios de drenaje. El sustrato utilizado fue vermiculita, de granulometría variable entre 0,75 y 8 mm de diámetro, de esta manera se analizaron 8 cajas por cada tratamiento con 25 semillas sembradas en cada caja, comparando el tratamiento de desinfección seleccionado (40 g de Cl activo / l durante 5 min.) con el testigo sin tratar. En este caso se tuvieron en cuenta los porcentajes de plántulas dañadas sobre el total de las germinadas.

Todas las pruebas para la determinación del poder germinativo se llevaron a cabo en cámaras de fotoperiodo y temperatura controlados, incubando las muestras a 25°C y 12 h/día de iluminación durante 8-9 días, tras los cuales se realizaron los conteos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza unifactorial.

Obtención de extractos

Para obtener los metabolitos exudados por los patógenos estudiados se añadieron pastillas del cultivo agarizado de unos 2 cm. de diámetro, tomado del borde de la colonia en crecimiento, a matraces Erlenmeyer de 250 ml con medio líquido PD (Patata-Dextrosa) estéril.

Los cultivos líquidos se mantuvieron en agitador orbital a 140 r.p.m. y en oscuridad durante períodos de 3, 7 y 11 días. Transcurrido este tiempo, los cultivos líquidos se filtraron a través de un doble filtro de papel Millipore de tamaño de poro de 0.45 µm. Método como el indicado por MONTROYA *et al.* (2001) y FERNÁNDEZ-CORRAL *et al.* (2002).

Pruebas de patogenicidad de los micetos y de sus extractos acuosos.

De entre todos los géneros de hongos presentes en las semillas analizadas se seleccionaron los de más frecuencia de aislamiento, los códigos que identifican cada aislado así como su procedencia se presentan en el cuadro 1.

La producción de las masas miceliales y conidios necesarios para inocular las semillas se realizó sobre PDA, incubándolo en cámara climática a 25°C en oscuridad, durante 5-6 días.

Tras el periodo de incubación se añadió a 400 ml de agua destilada el contenido de 2 placas de petri por aislado y se homogeneiza el medio con una batidora.

La aplicación se realizó repartiendo los 400 ml de inóculo sobre 25 semillas colocadas previamente en recipientes de plástico con el sustrato de vermiculita, manteniendo condiciones de fotoperiodo de 2500 lux durante 14h/día con salto térmico de 5°C oscilando entre 25°C (14h) y 20°C (10 h).

Este mismo proceso se repitió 3 veces con cada aislado. Asimismo, se repitieron los ensayos otras tres veces con la densidad de inóculo reducida a la mitad. Las densidades de inóculo resultantes en los distintos preparados se muestran en el cuadro 1.

El conteo y la observación de daños producidos sobre las plántulas emergidas se efectuaron tras un período de incubación de 10 días, realizándose paralelamente en cada uno de los ensayos testigos sin inóculo.

Una vez obtenidos los extractos de los aislados de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium*, se aplicaron sobre las semillas mediante el procedimiento anteriormente utilizado en las pruebas de patogenicidad, con la salvedad de que una vez regadas con los metabolitos, y cubiertas por una fina capa de vermiculita, las semillas no se volvían a regar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los ensayos de desinfección fijaron el mayor porcentaje de germinación media el de las semillas sumergidas durante

Cuadro 1. Códigos, procedencia y densidad de inóculo de las diferentes especies fúngicas ensayadas.

| Aislados | Códigos | Lote de procedencia | Localidad / año de cosecha |
|--|---------|---------------------|----------------------------|
| <i>Penicillium rugulosum</i> Thom. | Pe-1 | B-5 | Badajoz / 1997 |
| | Pe-2 | M-30 | Madrid / 1998 |
| <i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link | Cla-1 | B-10 | Badajoz / 1998 |
| | Cla-2 | M-38 | Madrid / 1998 |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin. | Rhi-1 | M-39 | Madrid / 1998 |
| <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg. | Fus-1 | M-29 | Madrid / 1998 |
| | Fus-2 | B-6 | Badajoz / 1997 |
| <i>Alternaria alternata</i> (Fries) von Keissler | Al-1 | M-14 | Madrid / 1997 |
| | Al-2 | B-6 | Badajoz / 1997 |
| <i>Aspergillus Niger</i> van Tieghem | As-1 | M-8 | Madrid / 1992-1996 |
| <i>Aspergillus flavus</i> Link. | As-2 | M-30 | Madrid / 1998 |

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección y evaluación del poder germinativo de las semillas.

| Tratamientos | Tiempo | Ensayos en cajas de Petri * | Ensayos en toalla * | Ensayos con vermiculita ** |
|-----------------------|---------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|
| 40 g de Cl activo / l | 5 min. | 93 % | 96 % | 3 % a |
| 40 g de Cl activo / l | 10 min. | 75 % | 90 % | - |
| 20 g de Cl activo / l | 5 min. | 86 % | 92 % | - |
| 20 g de Cl activo / l | 10 min. | 76 % | 93 % | - |
| Testigo | Testigo | 91 % | 97 % | 15 % b |

* Resultados expresados en porcentaje de germinación de semillas.

** Resultados expresados en porcentaje de plántulas dañadas.

5 min. en hipoclorito sódico sin diluir, con un porcentaje de germinación del 93%, incluso superior al del testigo (91%). Las comparaciones entre las diferentes concentraciones y tiempos de desinfección se muestran en el cuadro 2.

Estos datos, unidos a la gran contaminación de hongos presente en las muestras de semilla utilizadas como testigo hacen del método de desinfección consistente en sumergirlas durante 5 min. en hipoclorito sódico (40 g de Cl activo / l) el más adecuado para utilizar en los ensayos de patogenicidad. Una vez decidido este punto y para verificar los resultados del tratamiento elegido, se realizaron nuevos ensayos de germinación en cajas con vermiculita para observar su comportamiento en un sustrato igual al que se utilizará en los ensayos de inoculación. Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento y el testigo. Los porcentajes de plántulas dañadas, que en el testigo llegaban al 15 %, se mantienen en un 3 % en los lotes de semillas sometidos al tratamiento de desinfección.

La desinfección previa de las semillas antes de los ensayos de inoculación con los diferentes metabolitos, nos permite ofrecer una mayor fiabilidad en los resultados.

Resultados obtenidos con densidades de inóculo simple.

La inoculación de los diferentes hongos dio como resultado efectos negativos sobre los porcentajes de germinación (Cuadro 3), las diferencias con relación al testigo son siempre significativas. El porcentaje de

emergencia más alto es siempre el del testigo, con un 86 %.

El menor número de plántulas emergidas se corresponde con las inoculaciones de los aislados Rh-1 y Al-1, con 29 y 19% de disminución del porcentaje de emergencia respecto al testigo.

Las diferencias observadas entre *Aspergillus niger*, con un 67% de germinación, y *A. flavus*, con un 76%, tienen una posible explicación en el diferente grado de patogenicidad que cada especie pueda presentar ante un mismo hospedante, grado que dependerá de muchos factores, como los diferentes metabolitos excretados por cada hongo y su especificidad, la velocidad de crecimiento, etc. En este caso se comprueba como los mayores daños sobre la germinación se producen por el aislado de *A. niger*, que cuenta con una mayor densidad de conidias y una mejor respuesta frente a las altas temperaturas, frente al aislado de *A. flavus*.

Los daños observados en las plántulas resultantes de las inoculaciones de semillas con ambas especies de *Aspergillus* consisten en necrosis en la raíz principal y en las secundarias, llegando a rodearlas por completo, y estrangulándolas. En la parte aérea aparecen manchas sobre el tallo, de coloración oscura y con el contorno perfectamente delimitado.

Las inoculaciones con aislados de *Alternaria alternata* provocaron disminuciones en la emergencia de plántulas del 24 y 15 % respecto al testigo. Los daños son similares a los anteriormente descritos para *Aspergillus*, pero en este caso las manchas del hipocotilo

Cuadro 3. Plántulas de cardo (*Cynara cardunculus*) emergidas y dañadas tras el tratamiento con diferentes densidades de inóculo.

| Especie | Código de aislado | Densidad de inóculo Simple | | | | Densidad de inóculo Doble | | | |
|---------------------------------|-------------------|----------------------------|-----|-------------------|----|---------------------------|-----|-------------------|------|
| | | Porcentaje de emergencia | | Plántulas dañadas | | Porcentaje de emergencia | | Plántulas dañadas | |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | Cla-1 | 70 % | cd | 6 % | ab | 70 % | cd | 22 % | bcde |
| | Cla-2 | 77 % | e | 13 % | bc | 52 % | ab | 20 % | bcde |
| <i>Penicillium rugulosum</i> | Pe-1 | 70 % | cd | 10 % | bc | 63 % | abc | 27 % | de |
| | Pe-2 | 71 % | cde | 6 % | ab | 75 % | cd | 28 % | e |
| <i>Rhizopus stolonifer</i> | Rh-1 | 57 % | a | 8 % | ab | 48 % | a | 26 % | cde |
| <i>Aspergillus niger</i> | As-1 | 67 % | bc | 9 % | bc | 70 % | bcd | 10 % | ab |
| <i>Aspergillus flavus</i> | As-2 | 76 % | de | 15 % | c | 71 % | cd | 18 % | bcde |
| <i>Alternaria alternata</i> | Al-1 | 62 % | ab | 10 % | bc | 68 % | bc | 12 % | abc |
| | Al-2 | 71 % | cde | 14 % | bc | 67 % | bc | 21 % | bcde |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | F.m-1 | 67 % | bc | 10 % | bc | 65 % | bc | 14 % | abcd |
| | F.m-2 | 63 % | b | 9 % | bc | 62 % | abc | 17 % | bcde |
| Testigo | T | 86 % | f | 1 % | a | 83 % | d | 1 % | a |

tienen un contorno menos delimitado y coloración más clara, presentándose longitudinalmente a lo largo del tallo.

En algunas plántulas, tanto en las inoculaciones con *Aspergillus* como con *Alternaria*, una vez emergidos los callados, se observa la aparición de crecimiento micelial del hongo sobre los mismos cotiledones, llegando a esporular y constituyendo una fuente de inóculo o reinfección del propio cultivo.

La inoculación con *F. verticillioides*, provocó bajos porcentajes de emergencia (67 y 63 % en cada uno de los dos aislados inoculados). En ambos casos hay diferencias significativas con relación al testigo, con disminuciones del porcentaje de emergencia del 19 y 23 % respectivamente. Muchas de las plántulas emergidas presentaban raíces necrosadas, síntoma característico del ataque de *Fusarium*.

En cuanto al número de plántulas dañadas, los datos observados para cada tratamiento varían desde un 1% en el testigo a un 15% en As-2.

En la inoculación con *Aspergillus*, de la misma forma a como ocurre con *Cladosporium*, el aislado que, tras los ensayos de emergencia de plántulas, tenía el menor porcentaje y que contaba por tanto con una mayor capacidad parasitaria es el que produ-

ce menor número de plántulas dañadas. En este caso, las inoculaciones con *A. niger* presentan un 67% de emergencia y un 9% de plántulas dañadas del total de las emergidas. Cuando se inoculó con *A. flavus*, la emergencia fue del 76%. Es decir, un 12% superior a las inoculadas con *A. niger* y, sin embargo, el porcentaje de plántulas dañadas era del 15%. Al tratarse de dos especies distintas, podría entenderse una diferente capacidad parasitaria, otra interpretación que puede darse a este comportamiento, es que varios mecanismos están implicados en las acciones sobre la emergencia y lesiones posteriores sufridas por las plántulas y que, probablemente, no actúen los mismos. Estos porcentajes han de tenerse muy presentes a la hora de valorar los daños producidos por el hongo, pues las semillas que den lugar a plántulas atrofiadas o dañadas seriamente no conseguirán desarrollarse con normalidad una vez sembradas en los campos de cultivo.

Las plántulas atacadas por *Aspergillus* presentaban daños visibles en forma de manchas oscuras de contorno delimitado. Resultados que coinciden con los obtenidos por HARMAN y GRANETT, (1972).

Tras la inoculación de las semillas con dos aislados diferentes de *Alternaria*, se

observó un alto número de plántulas dañadas, con porcentajes del 10 y 14% respectivamente, con diferencias significativas respecto al testigo.

Los síntomas presentes en las plántulas dañadas consisten en manchas de un color parduzco más claras que las producidas por los hongos anteriormente inoculados, más o menos delimitadas, que discurren longitudinalmente a lo largo del tallo. Estos síntomas son idénticos a las lesiones que GAETAN y MADIA (1998) describen sobre los tallos de colza canola.

La inoculación con dos aislados de *Fusarium verticillioides*, mostró porcentajes de un 10 y 9% respectivamente de plántulas dañadas sin que aparecieran diferencias significativas entre ellas. Los daños se caracterizan por la aparición de gran cantidad de raíces necróticas, con necrosis tanto distales como intermedias. Las plántulas dañadas presentaban un alto número de manchas de color claro a lo largo del hipocotilo.

Resultados obtenidos con densidades de inóculo doble

Los resultados obtenidos tras la duplicación del inóculo (Cuadro 3), fueron también sometidos a un análisis de varianza unifactorial. Los resultados obtenidos indican la existencia de diferencias significativas entre algunos de los tratamientos y el testigo.

En el cuadro 3 se aprecia como los porcentajes de emergencia disminuyen considerablemente tras las inoculaciones. Los mayores porcentajes de emergencia se observan en Pe-2 y As-2, con un 8 y 12 % inferior al testigo, sin diferencias significativas con respecto a él. Esta capacidad parasitaria de las dos especies se corresponde con lo observado para una densidad de inóculo simple, lo que indica que, a partir de una densidad de inóculo, el incremento no tiene efecto significativo. Tampoco difieren significativamente con relación al testigo los tratamientos Cla-1 y As-1. A diferencia de los tratamientos con los aislados Cla-2, Pe-1, Rh-1, Al-1, Al-2 Fm-1 y Fm-2 que presentan todos ellos diferencias significativas con el testigo.

Al duplicar el inóculo no se aprecian diferencias significativas en la capacidad parasitaria de los aislados de *P. rugulosum*, *A. alternata* y *F. verticillioides*, así como de las dos especies de *Aspergillus*, *A. niger* y *A. flavus*. Coincide esto solo en parte con los resultados de el cuadro 3, en la que únicamente entre los aislados de *Penicillium* y *Fusarium* no aparecían diferencias significativas. Indicando que la capacidad parasitaria de los aislados podría tender a igualarse a una cierta densidad de inóculo.

Solamente los aislados de *C. herbarum* mantienen diferencias significativas entre sí, coincidiendo con las diferencias aparecidas para una densidad de inóculo simple (Cuadro 3).

En el caso de las especies de *Fusarium* y *Rhizopus* que, con una densidad de inóculo medio producían los mayores efectos sobre la emergencia de plántulas, continúan manteniendo esta capacidad al duplicar el inóculo, disminuyendo los porcentajes de emergencia respecto al testigo en un 18 y 21 % en el caso de *Fusarium*, y en un 35 % en *Rhizopus*. Entre todos los porcentajes de nascencia obtenidos al duplicar el inóculo la disminución más drástica tiene lugar tras la inoculación con *Rhizopus*. Este resultado que, como hemos comprobado, se debe a la acción en la germinación de las semillas, se agudiza en un 16% cuando se dobla la densidad del inóculo. La baja aparición de necrosis radiculares asociadas a la inoculación con este hongo permite pensar que una vez emergida la semilla, el miceto no afecta de una manera tan drástica al desarrollo de las plántulas como los demás géneros estudiados ni aún a dosis de inóculo elevadas.

La capacidad parasitaria de cada uno de los aislados se corresponde con la anteriormente observada en los ensayos con densidades de inóculo simple, si bien se aprecia un aumento en los porcentajes de daños.

El mayor aumento se produce en *Penicillium*, en *Cladosporium herbarum* y *Rhizopus stolonifer* también se aprecia el incremento en los daños sobre las plántulas, en contraposi-

ción, los aislados de *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium* no aumentan tan drásticamente el número de plántulas dañadas.

En todos los casos se producen serios daños sobre plántulas ya germinadas. Estas plántulas resultan seriamente afectadas y no tendrán un desarrollo normal en campo. En muchos casos, las plántulas resultarán inviables e incluso morirán. Pero en aquellos en los que no se produjera la muerte de la planta, los rendimientos finales se verían reducidos, tanto como consecuencia de una disminución del vigor de la planta (y, por consiguiente, del porcentaje de materia seca), como por una reducción del número, calidad y viabilidad de las semillas.

Resultados sobre las pruebas de toxicidad obtenidas con los extractos fúngicos

Las pruebas de patogenicidad con extractos acuosos ensayados se llevó a cabo con dos aislados de *Alternaria*, dos aislados de *Aspergillus*, un aislado de *Penicillium* y dos aislados de *Fusarium*, presentes en el inventario fúngico, y con alta capacidad potencial de producir concentraciones de metabolitos tóxicos que afecten a la germinación y nascencia de las semillas (KOHOMOTO *et al.*, 1982; TIETJEN *et al.*, 1983; COLE *et al.*, 1973; HOLESTEIN y STOESSL., 1988). Los resultados se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Evaluación de los filtrados de los cultivos líquidos a los 3, 7 y 11 días de agitación del hongo sobre semillas y plántulas de cardo (*Cynara cardunculus*). Los daños en porcentajes de plántulas afectadas sobre el total de las emergidas.

| Aislado | Emergidas | | | Atrofiadas | | |
|---------|----------------|-------------|------------|--------------------|------------|-------------|
| | 3 días | 7 días | 11 días | 3 días | 7 días | 11 días |
| Testigo | 88 ± 7,4 b | 83 ± 6,7 b | 86 ± 5,8 b | 6 ± 5 a | 8 ± 5,7 a | 5 ± 5,7 a |
| Al-1 | 76 ± 8,1 a | 70 ± 5,3 a | 74 ± 5,8 a | 23 ± 5,2 b | 20 ± 5,5 b | 25 ± 8,4 b |
| Al-2 | 75 ± 5,8 a | 71 ± 5,6 a | 69 ± 9,4 a | 17 ± 5,9 b | 37 ± 5,4 c | 33 ± 11,8 c |
| Testigo | 80 ± 7,9 a | 79 ± 8,5 a | 85 ± 8,2 b | 8 ± 3,5 a | 8 ± 6,8 a | 7 ± 5,6 a |
| As-1 | 72 ± 8,6 a | 72 ± 11,9 a | 75 ± 11 a | 23 ± 6,6 b | 32 ± 12 c | 21 ± 7,7 b |
| As-2 | 77 ± 12,1 a | 72 ± 11,4 a | 74 ± 10 a | 20 ± 4,8 b | 19 ± 6,4 b | 21 ± 6,4 b |
| Testigo | 88 ± 4,3 b | 77 ± 14,9 b | 92 ± 4,3 b | 1 ± 2,8 a | 1 ± 2,8 a | 1 ± 2,5 a |
| Fm 1 | 51 ± 12,2 a | 60 ± 7,1 a | 73 ± 4,7 a | 20 ± 13,6 b | 10 ± 8,3 b | 16 ± 6,9 b |
| Fm 2 | 45 ± 6,1 a | 60 ± 4,3 a | 74 ± 6,8 a | 25 ± 15,1 b | 10 ± 8,5 b | 15 ± 4,7 b |
| Testigo | 85 ± 5,4 b | 89 ± 4,9 b | 86 ± 5,5 b | 6 ± 4,7 a | 8 ± 5,3 a | 8 ± 4,3 a |
| Pe-1 | 77 ± 9,1 a | 74 ± 5,5 a | 78 ± 9,3 a | 18 ± 8,6 b | 19 ± 11 b | 22 ± 12 b |
| Aislado | Raíz necrosada | | | Manchas hipocotilo | | |
| | 3 días | 7 días | 11 días | 3 días | 7 días | 11 días |
| Testigo | 3 ± 2,7 a | 8 ± 5,7 a | 4 ± 3,9 a | 5 ± 4,8 a | 4 ± 4,7 a | 5 ± 4,2 a |
| Al-1 | 12 ± 6,2 b | 13 ± 5,4 b | 13 ± 8,9 b | 22 ± 9,1 b | 34 ± 18 b | 27 ± 7,3 b |
| Al-2 | 15 ± 7,7 b | 29 ± 8 c | 20 ± 8,6 b | 24 ± 11,4 b | 35 ± 6 b | 34 ± 17,7 b |
| Testigo | 6 ± 4,5 a | 6 ± 3,9 a | 6 ± 3,4 a | 0 ± 0 a | 1 ± 2 a | 2 ± 3 a |
| As-1 | 23 ± 8,3 b | 78 ± 5,5 c | 32 ± 9,5 c | 20 ± 5,3 b | 26 ± 6,6 c | 22 ± 7,6 c |
| As-2 | 24 ± 4,9 b | 18 ± 9,4 b | 19 ± 6,6 b | 17 ± 3,3 b | 16 ± 7,7 b | 12 ± 3,8 b |
| Testigo | 0 ± 0 a | 0 ± 0 a | 0 ± 0 a | 6 ± 4,9 a | 2 ± 3,6 a | 1 ± 2,6 a |
| Fm 1 | 0 ± 0 a | 1 ± 3,5 a | 1 ± 3,1 a | 17 ± 10,3 b | 7 ± 6,8 a | 3 ± 4,1 a |
| Fm 2 | 0 ± 0 a | 0 ± 0 a | 0 ± 0 a | 39 ± 19,2 c | 20 ± 7,7 b | 9 ± 5,9 b |
| Testigo | 7 ± 4,3 a | 9 ± 3,8 a | 7 ± 4,1 a | 5 ± 3,4 a | 4 ± 4,2 a | 3 ± 3,7 a |
| Pe-1 | 12 ± 7,5 a | 15 ± 10,2 a | 19 ± 14 a | 8 ± 3,4 b | 4 ± 3 a | 6 ± 4,4 a |

Pruebas de toxicidad con los extractos obtenidos a partir de *Alternaria alternata*.

La disminución en el porcentaje de emergencia de plántulas tras el riego con extractos de *A. alternata* (Cuadro 4) tiene lugar en igual cuantía en los dos aislados, no pudiendo apreciarse diferencias significativas entre ellos, aunque sí con respecto al testigo.

Los resultados ponen de manifiesto la distinta capacidad parasitaria de los dos aislados, siendo los metabolitos del aislado AI-2 los que mayor porcentaje de daños causan a las plántulas, con un máximo en su actividad fitotóxica extracelular cercano a los 7 días de incubación del cultivo líquido con un 37 % de plántulas atrofiadas y un 29 % de plántulas que presentaban atrofas en las raíces.

El aislado AI-1 causa menores porcentajes de daños, y lo hace además de manera constante desde el tercer día. Los cuadrados medios presentan diferencias significativas frente al testigo en los tres periodos de agitación del hongo y entre los dos aislados para periodos de 7 y 11 días de incubación.

Estos datos confirman la variabilidad genética presente entre los diferentes aislados de *A. alternata* puesta de manifiesto en las inoculaciones directas del patógeno y confirmado con la inoculación de metabolitos. La observación de los mismos síntomas aparecidos sobre las plantas tras la inoculación con el filtrado que tras la inoculación con los patógenos directamente nos permite concluir que los daños observados en las plántulas infectadas son debidos a la producción de micotoxinas y no a la invasión física del hongo. Estos resultados coinciden con los presentados por HARMAN y GRANETT, (1972) y HANDA *et al.* (1982).

Se ha comprobado además, que el aislado cuyos metabolitos producían mayores daños tras ser inoculados sobre las semillas coincide con el aislado que producía mayor número de conidias, lo que nos permite pensar en una probable relación entre la producción de conidias y la actividad fitotóxica extracelular del hongo.

Las micotoxinas producidas por *Alternaria* sp. no son específicas de la planta del

cardo (AGRIOS, 1996), pero, aunque los daños producidos por estos metabolitos sean mucho más manifiestos en sus hospedantes habituales, si la cantidad de toxinas es lo suficientemente alta, que sea o no hospedante no es un factor limitante para la aparición de daños (HARMAN y GRANETT, 1972).

La representación gráfica (Fig. 1) pone de manifiesto la distinta capacidad parasitaria de los diferentes aislados de *Alternaria*.

Pruebas de toxicidad con los extractos líquidos obtenidos a partir de *Aspergillus niger* y *A. flavus*.

Aspergillus es un hongo que, además de aparecer en un elevado número de muestras analizadas en el inventario, tiene una gran capacidad potencial de producir metabolitos fitotóxicos para las semillas (BROWN *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1981; KING *et al.*, 1983; SANCHIS *et al.*, 1983; WIDSTROM *et al.*, 1990; FERNÁNDEZ-CORRAL *et al.*, 2002).

En el cuadro 4 se observa como únicamente aparecen diferencias significativas entre los porcentajes de emergencia de plántulas del testigo y los tratamientos cuando la extracción se prolonga 11 días. Probablemente la concentración de posibles metabolitos obtenidos con 3 y 7 días de agitación del hongo antes de su extracción, no sea lo suficientemente alta como para impedir la germinación y emergencia de las plántulas. Los mayores daños producidos sobre las raíces coinciden con los producidos sobre la parte aérea en lo que se refiere al período de agitación del hongo antes de ser aplicados sus extractos, cercano al tercer día en *A. niger* y al séptimo día en *A. flavus*, mostrando así la diferente capacidad parasitaria de cada una de las especies de *Aspergillus* utilizadas en el estudio.

Los porcentajes de plántulas atrofiadas muestran diferencias significativas entre las dos especies y el testigo, que presenta siempre porcentajes muy bajos de daños, no superando en ningún caso al 8%. Posiblemente, la atrofia o el retraso en el crecimiento observado se produzca con bajas concentraciones de posibles tóxicos en el medio,

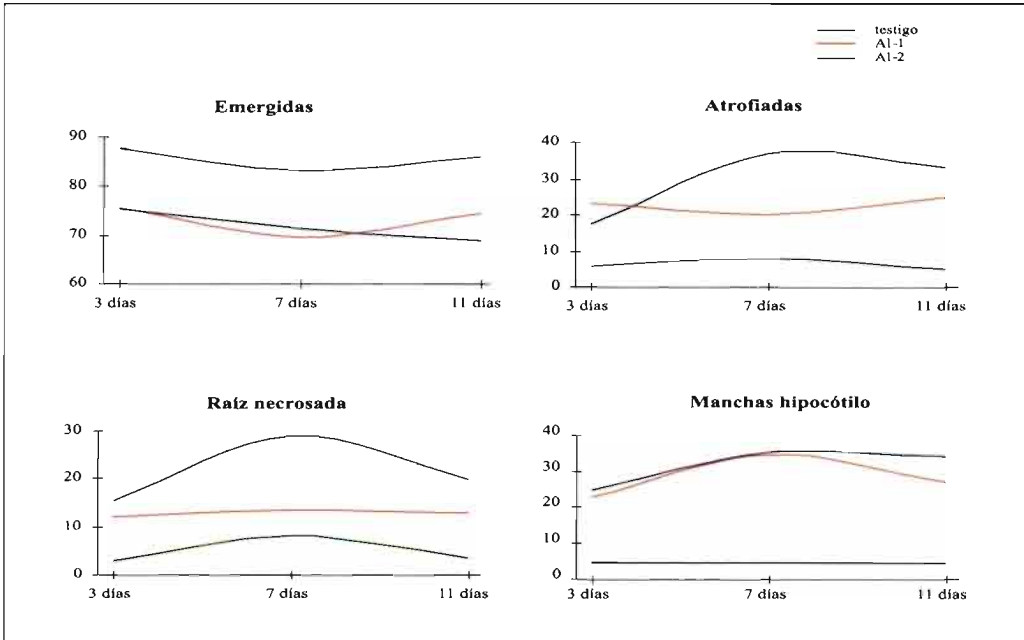


Figura 1. Gráficas comparativas de las pruebas de patogenicidad con los extractos de dos aislados de *Alternaria alternata*.

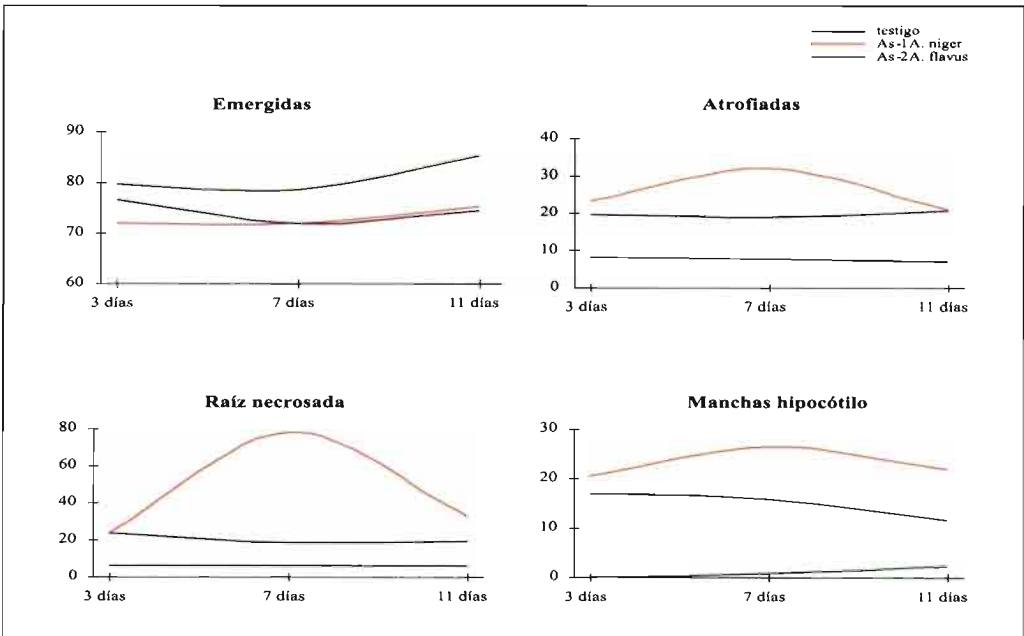


Figura 2. Gráficas comparativas de las pruebas de patogenicidad con extractos de *Aspergillus Níger* (As-1) y *Aspergillus flavus* (As-2).

por lo que la severidad de los daños no se ve afectada por el cambio que la concentración de tóxicos sufre a lo largo de los distintos períodos de incubación del hongo.

Los porcentajes de plántulas con raíces necrosadas sufren grandes variaciones en los tratamientos con extractos de una especie u otra. Si bien los extractos de las dos especies causan abundantes necrosis en plántulas, los mayores daños se producen con extractos procedentes de períodos de incubación del hongo distintos para cada especie. El aislado de *A. flavus* (As-2) produce el mayor porcentaje de daños al inocular los extractos de 3 días de incubación, con un 24% de plántulas con raíces necrosadas, porcentaje que disminuye a un 18 y 19% con períodos de 7 y 11 días de incubación, respectivamente (ver Fig. 2).

En inoculaciones con metabolitos de *A. niger* (As-1), los daños son similares a los producidos con los metabolitos de *A. flavus* (As-2) obtenidos a los 3 días de agitación del hongo. Sin embargo, en extracciones realizadas a los 7 y 11 días, las necrosis producidas por los extractos de As-1 son muy superiores.

Los porcentajes de daños observados son muy altos, llegando hasta el 78% de raíces de plántulas dañadas por *A. niger* a los 7 días de incubación frente al 6% de raíces dañadas que presenta el testigo.

Las manchas aparecidas sobre el hipocotilo de las plántulas tienen la misma morfología tras la inoculación con los extractos que tras la inoculación con los mismos hongos. Los mayores porcentajes de plántulas dañadas se presentan tras ser inoculadas con metabolitos obtenidos tras 7 días, en el caso de *A. niger* (26% de plántulas con hipocotilo dañado), y 3 días, en el caso de *A. flavus* (17% de plántulas con hipocotilo dañado). Son destacables las grandes diferencias producidas con respecto al testigo, donde el porcentaje de plántulas que presentan daños en el hipocotilo es prácticamente nulo.

Las gráficas comparativas (Fig. 2) muestran como las dos especies tienen comportamientos diferentes en lo que se refiere a los

daños ocasionados, pues mientras que *A. niger* mantiene constantes a lo largo de los tres periodos de incubación los porcentajes de daños, en *A. flavus* se aprecia claramente un punto máximo en la producción de sustancias fitotóxicas extracelulares que tiene lugar cerca del séptimo día de agitación del hongo. Estos resultados nos muestran la diferente toxicidad de cada una de las especies de *Aspergillus* utilizadas en el estudio, y que permiten asegurar, que la producción de metabolitos tóxicos está regulada por el hongo, y que no aumenta linealmente con el crecimiento micelial.

Pruebas de toxicidad con los extractos líquidos obtenidos a partir de *Fusarium verticillioides*.

Se analizaron dos aislados diferentes de *Fusarium verticillioides*, comparándolos con un testigo. Este género es el productor más importante de fumonisinas (FANDOHAN *et al*, 2004; MUNKVOLD *et al*, 1997). La disminución en el porcentaje de emergencia de plántulas tras la inoculación con metabolitos de *F. verticillioides* (Cuadro 4), tiene lugar en similar cuantía en ambos aislados, no pudiendo apreciarse diferencias significativas entre ellos aunque sí con respecto al testigo.

La emergencia es un 37 y 43% respectivamente inferior al testigo con metabolitos obtenidos a los 3 días. La emergencia observada tras la inoculación con metabolitos extraídos a los 7 y 11 días aumenta en los dos aislados estudiados.

La elevada capacidad germinativa de los filtrados a los 3 días de incubación del hongo, que se ve disminuida a los 7 y 11 días parece indicar que se reduce la emisión de metabolitos tóxicos paralelamente al tiempo de incubación, de la misma manera que hacen pensar en la pérdida de toxicidad de los metabolitos ya producidos.

En los porcentajes de plántulas atrofiadas los mayores daños se aprecian en los ensayos realizados con metabolitos obtenidos tras 3 días de agitación con un 20 y 25% de plántulas atrofiadas. Daños que disminuyen con periodos de incubación mayores.

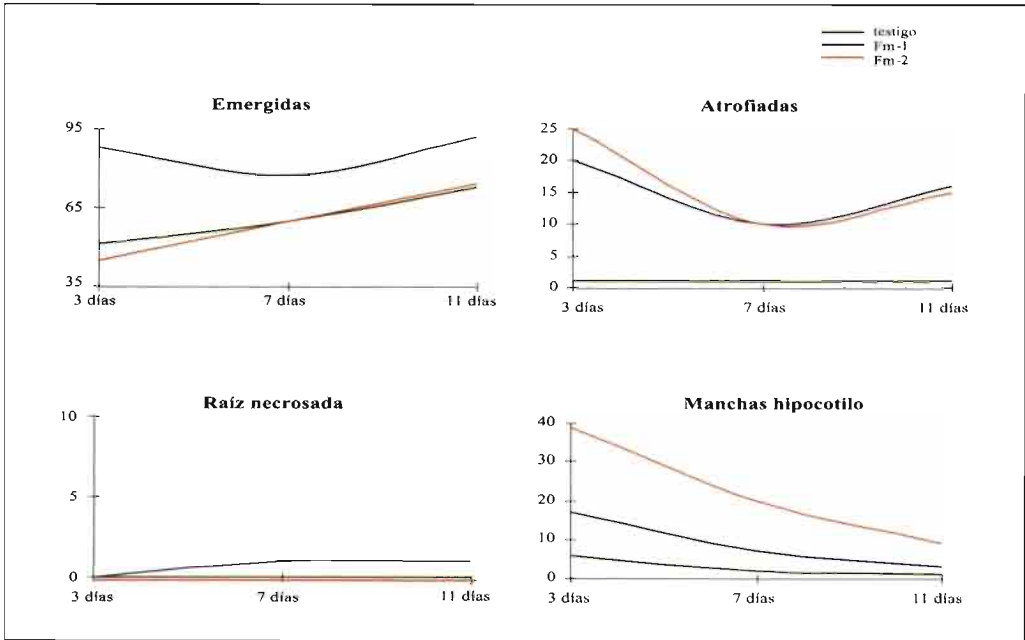


Figura 3. Gráficas comparativas de las pruebas de toxicidad con extractos de dos aislados (Fm-1 y Fm-2) de *Fusarium verticillioides*.

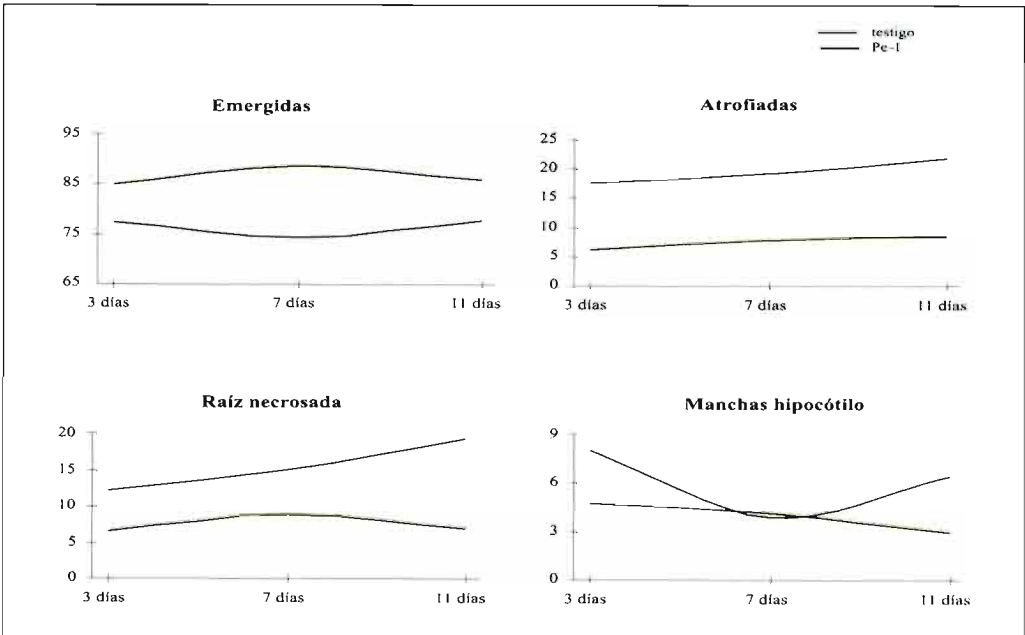


Figura 4. Gráficas comparativas de las pruebas de toxicidad con extractos de *Penicillium rugulosum* (Pe-1).

No se aprecia efecto alguno de las inoculaciones sobre las raíces de las plántulas, no parece por tanto que sea este un efecto de los metabolitos producidos por los aislados de *Fusarium verticillioides*. En contraposición al resultado de la inoculación con los dos aislados de *Fusarium verticillioides*, donde aparecían daños en porcentajes de un 10 y 9% respectivamente de plántulas dañadas (Cuadro 3), caracterizándose éstas por la aparición de gran cantidad de raíces necróticas, con necrosis tanto distales como intermedias.

En cambio, en los porcentajes de manchas en el hipocotilo, los mayores porcentajes de daños vuelven a ser los observados tras la inoculación de metabolitos obtenidos tras tres días de agitación, disminuyendo paulatinamente con mayores periodos de agitación de los aislados (ver Fig. 3).

Pruebas de toxicidad con los extractos obtenidos a partir de *Penicillium rugulosum*.

La capacidad de producción de toxinas que presenta este género y su efecto sobre las semillas almacenadas son sobradamente conocidos (PRANGE *et al.*, 2005). Comparándose un único aislado con un testigo, los resultados del conteo realizado a los 10 días se muestran en el cuadro 4.

Se observa un descenso en los porcentajes de emergencia tras las inoculaciones con extractos de *P. rugulosum* de un 8 a un 15% con respecto al testigo. Estos porcentajes permanecen casi constantes a lo largo de los tres periodos de incubación del hongo, con un máximo, a los 11 días de agitación del cultivo líquido, del 78% de plántulas emergidas, no muy alejado del 77% observado a los 3 días de agitación del hongo.

El ensayo con extractos acuosos de *P. rugulosum* dio como resultado porcentajes de plántulas atrofiadas, en los que se aprecia un mínimo ascenso en la actividad fitotóxica a medida que aumenta el período de agitación al que ha sido sometido el hongo. A diferencia de los ensayos con *Alternaria alternata* y *Aspergillus niger* y *flavus*, los extractos de *Penicillium* producen atrofiadas a

partir de los 3 días de agitación del hongo con un 18% de plántulas afectadas, aunque sufren un aumento lineal al menos hasta los 11 días de incubación del hongo, con un máximo del 22% de plántulas atrofiadas a los 11 días de incubación del hongo.

Las gráficas comparativas entre las inoculaciones con metabolitos obtenidos a partir de cultivos líquidos de *Penicillium* y el testigo (Fig. 4) muestran el efecto que estos metabolitos tienen sobre las plántulas tratadas. Los daños aumentan linealmente con los días de agitación del hongo. Esto nos lleva a la conclusión de que, en el caso de *Penicillium*, la producción de metabolitos está influenciada por el periodo de incubación del hongo, aumentando así linealmente al menos hasta los 11 primeros días.

La inhibición de la germinación fue, por lo general, mayor al inocular las semillas con el cuerpo miceliar y conidial de los aislados directamente que con sus extractos acuosos. Así ocurre en las inoculaciones con *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*. En el caso de las inoculaciones con *Fusarium moniliforme*, los mayores porcentajes de inhibición de la germinación se obtuvieron con los extractos acuosos.

Por regla general las semillas de cardo presentan mayores porcentajes de daños y atrofiadas cuando son inoculadas con los extractos acuosos. Así, los extractos de *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Níger* y *Fusarium moniliforme* presentan mayores porcentajes de plántulas atrofiadas y dañadas (Cuadro 4) que el observado tras la inoculación con los cuerpos miceliales directamente (Cuadro 4).

El echo de que muchos autores hayan descrito daños similares en la germinación y nascencia de semillas de diferentes especies nos hace pensar que posiblemente no se trate de toxinas específicas.

Los géneros estudiados en este trabajo son de poca importancia, en general, en Patología Vegetal, puesto que no producen enfermedades aparentemente llamativas, sin embargo su papel en la germinación y muerte y atrofia de plántulas puede tener una tras-

cendencia importante que podría alcanzar a lo que en los bancos de germoplasma se denomina envejecimiento de las semillas y

pérdida de germinación. Pues bien, estos hongos podrían tener una estrecha relación con esa falta de germinación.

ABSTRACT

PALMERO D., C. IGLESIAS, L. VARÉS, J. SINOBAS (†). 2006. Evaluation of the effect of fungal population and their aqueous extracts over thistle seeds (*Cynara cardunculus* L.) germination and nascence. *Bol. San. Veg. Plagas*, **32**: 659-672.

In previous works, the fungal population present in seeds of 54 cultivars of thistle was characterized. A total of 4400 seeds were tested and 15 different genera of fungi were identified.

The present work evaluates the effect of such fungi and their aqueous extracts over seed germination and nascence.

Pathogenicity tests have been made for 2 strains from each of the 6 most quantitative important genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* and *Alternaria*), as well as for their metabolites produced after 3, 7 and 11 days of incubation

The fungal inoculation results show negative effects on seed germination. Those effects were maximum after inoculation with *Rhizopus stolonifer* (29% less germination) and *Fusarium verticillioides*.

Nascence percentage decreases after inoculum concentration duplication and the number of damaged plants grows drastically. In the significative case of inoculation with *Cladosporium*, germination decreased 31% with that duplication, analogous as what happens with the rest of de genera, in lesser or greater degree.

Seedlings emerged after being inoculated with metabolites obtained from aqueous extracts showed the same symptoms (atrophy and damage on radicles and coleoptiles) than those described for the fungus itself. Metabolites of tested genera decrease as well germination.

Different parasitical ability for each species is shown by the results. There are also differences depending on the stirring period. Those data permit to assume that toxic metabolite production is fungal - regulated and does not have a linear relationship with myceliar growing.

Key words: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizopus stolonifer*, metabolites, toxicity, pathogenicity, seedlings.

REFERENCIAS

- AGRIOS, G. N., 1995. Fitopatología. UTEHA. Ed. Noriega.
- COLE, R. J.; KIRKSEY, W. J.; CUTLER, H.G.; DOUPNIK, B. L. and PECKHAM, J.C., 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on plants and animals. *Science*, **179**: 1324-1326.
- FERNÁNDEZ-CORRAL, J. A.; SANTOS, M.; BLANCO, R. y TELLO, J., 2002. Estado sanitario de las semillas de judía en los cultivos de Caniles (Granada). *Phytoma-España*, **139**: 16-21.
- FANDOHAN, P.; GBENOU, J.D.; GNONLONFIN, B; HELL, K.; MARASAS, W.F.O. and WINGFIELD, M. 2004. Effect of the essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 6824-6829.
- FOTTI, S.; MAUROMICALE, G.; RACCUA, S.A. ; FALLICO, B. ; FANELLA, F. and MACCARONE, E., 1999. Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomasa, grain yield and chemical composition of grain. *Industrial Crops and Products*, **10**: 219- 228.
- GAETAN, S. y MADIA, M. S., 1998. La mancha negra de la hoja (*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh.) en cultivos de colza cánola en Buenos Aires y Santa Fe, Argentina. *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**: 573-580.
- HANDA, A. K.; BRESSAN, R. A. and PARK, M. L., 1982. Use of plant cell cultures to study production and phytotoxicity of *Alternaria solani* toxin(s). *Physiological Plant Pathology*, **21**: 295-309.
- HARMAN, G. E. and GRANETT, A. L., 1972. Deterioration of stored pea seed, changes in germination, membrane permeability and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from aging. *Physiological Plant Pathology*, **2**: 271-278.
- HARMAN, G. E., 1972. Deterioration of stored seeds by *Aspergillus ruber*, extraction and properties of a toxin. *Phytopathology*, **62**: 206-208.

- HOLESTEIN, J. E. and STOESSL, A., 1983. Metabolites of *Alternaria solani*. Part IX: Phytotoxicity of altersolanol A. *Phytopathologische zeitschrift*, **108**: 143-147.
- JONES, R. K.; DUNCAN, H. E. and HAMILTON, P. B., 1981. Planting date, harvest date and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology*, **71**: 810-816.
- KING, S. B. and WALLIN, J. R., 1983. Methods for screening corn for resistance to kernel infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Pages 77-80 in: Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Diener, U. L.; Asquith, R.L. and Dickens, J. W. Eds. South Coop. Bull., 279. Auburn University, Auburn, AL.
- KOHMOTO, K.; VERMA, V. S.; NISHIMURA, S.; TAGAMI, M. and SCHEFFER, R. P., 1982. New outbreak of *Alternaria* stem cancer of tomato in Japan and production of host-selective toxins by the causal fungus. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.*, **17**: 1-8.
- KOMADA, H., 1975. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, **8**: 114-125.
- MONTOYA, J. R.; GÓMEZ VÁZQUEZ, J. M.; BLANCO PRIETO, R. y TELLO, J., 2001. Estado sanitario de las semillas de plantas aromáticas cultivadas en Almería. *Bol. San. Veg. Plagas*, **27**: 345-354.
- PRANGE, A.; MODROW, H.; HORMES, J; KRÄMER, J. and KÖLHER, P., 2005. Influence of mycotoxin producing fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 6930-6938.
- PALMERO, D.; IGLESIAS, C. y SINOBAS, J., 2005. Inventario fúngico asociado a las semillas de cultivares de Cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Bol. San. Veg. Plagas*, **31**VÍÑAS

(Recepción: 22 marzo 2006)

(Aceptación: 18 septiembre 2006)