

Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero

C. SOLDEVILLA

El Damping-off está considerado como el complejo fitopatológico que produce más bajas en los viveros e invernaderos forestales. En este trabajo se estudian las posibles vías de infección, los métodos de análisis y las especies fúngicas aisladas en plántulas del género *Pinus*, bajo condiciones de Invernadero.

C. SOLDEVILLA. Unidad Docente de Zoología Forestal, Enfermedades y Plagas Forestales. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

Palabras clave: Damping-off, *Pinus*, invernadero.

INTRODUCCION

Los mayores problemas de supervivencia que sufre la planta forestal se presentan durante los primeros años de su existencia y particularmente en el período en que se encuentra en el vivero o invernadero y en los meses posteriores a su plantación en los terrenos a repoblar.

El mayor responsable de la falta de salud de las plántulas en las instalaciones de producción son las micosis que dan lugar a infecciones que son más conocidas como complejo «Damping-off», definido por NERGAARD (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.

Los síntomas que desarrolla la enfermedad se pueden englobar en tres formas diferentes, en estrecha relación con la edad de la plántula:

«Damping-off» de pre-emergencia. Los daños se producen antes de emerger la plan-

ta del sustrato, produciendo marras de nacimiento por podredumbre total de la pequeña radícula (Fig. 1).

«Damping-off» de post-emergencia. Desde los 0 a los 3 meses. La plántula emerge por encima del sustrato pero es invadida por el hongo a través de la radícula, hasta el hipocótilo y pudriendo el cuello radicular. La parte aérea presenta una decoloración pardo-rojiza de sus hojas cotiledonares sin que llegue a producirse defoliación dando como resultado la caída en el suelo. Este síntoma da nombre a una de las acepciones con que se conoce la enfermedad en nuestro país, «caída de plántula», término equívoco ya que la misma sintomatología terminal puede ser desarrollada por factores ambientales como sequía, helada o por otros factores bióticos como larvas de *Melolonthinus*, *Tipúlidos* o imagos de *Gryllotalpa gryllotalpa* (Fig. 2).

«Damping-off» tardío (Root rot). Desde los 3 meses a los 2 años, coincidiendo con el inicio de la lignificación del tallo y finalizando con dos savias, edad máxima de las plántulas en el vivero. Los marchitamientos



Fig. 1.-Síntomas de «Damping-off de preemergencia» por ausencia de germinación a causa de un ataque radicular previo.

Fig. 2.-Caída de plántula en el sustrato, inconfundible síntoma de «Damping-off de postemergencia».



y decoloraciones en el follaje de la planta, producen una lenta podredumbre del sistema radical, seguido de grietas longitudinales en la zona del cuello, dando como resultado final el estrangulamiento definitivo de la raíz (Fig. 3).

En España, la patología forestal se ha centrado en las enfermedades de manifestación aérea, con una sintomatología clara y de fácil tipificación en un amplio abanico de especies. Pero en relación con los problemas de enfermedades producidas en vivero carecemos de información necesaria siendo mínimas la reseñas bibliográficas (TORRES JUAN, 1959; BENITO MARTÍNEZ & TORRES JUAN, 1965; ABREU & NOTARIO, 1986; TELLO, 1990; MUÑOZ, 1991).

La producción de planta forestal en contenedor bajo invernadero se ha incrementado durante los últimos años y aunque sufren las mismas enfermedades que en la siembra en era de vivero, las vías de contagio, el desarrollo de la infección y las medidas correctoras son diferentes, por lo que es necesario un estudio individualizado para cada tipo de cultivo.

Las pérdidas que pueden sufrir los viveristas son de un 100% en semilleros y entre el 15 y el 20% en contenedor.

La pérdida de producción durante el año 1989 y posteriores, en el invernadero del Centro Nacional de Mejora Genética Forestal «El Serranillo», ubicado en Guadalajara y perteneciente al ICONA fue el desencadenante del presente estudio.

El seguimiento completo de la producción del año 1992 en cuatro especies del género *Pinus*, constituyen los datos que resultaron del estudio.

La complejidad de la enfermedad y los diferentes agentes que pueden desencadenarla ha hecho necesario revisar los procesos de producción de la plántula, desde el análisis de la semilla que llega al recinto, el control de las características medioambientales e higiénicas del almacén y de los invernaderos, el estudio de los componentes del sustrato y del agua de riego, y el análisis de plántulas con síntomas de infección.

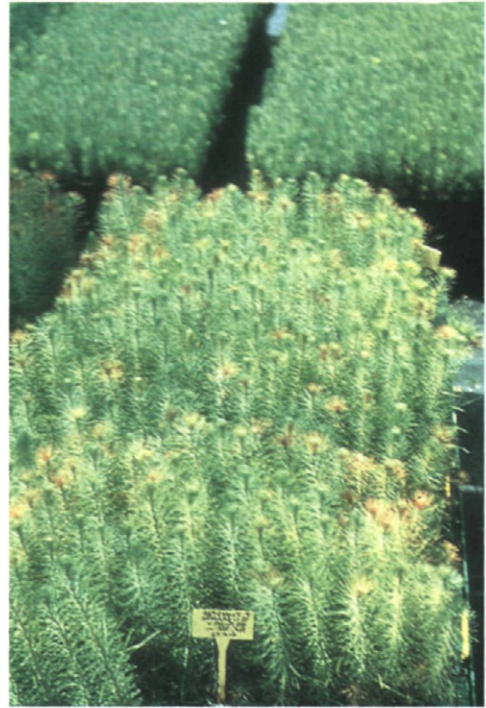


Fig. 3.—Apices decolorados, síntoma que se confunde con el efecto de heladas, inicio del «Damping-off tardío» o «Root-rot».

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Las especies de coníferas estudiadas fueron:

Pinus eldarica Medw., *P. halepensis* Miller., *P. pinaster* Aiton. y *P. sylvestris* L.

En el análisis de la semilla se utilizaron 300 semillas por especie y procedencia diferente. Este material provenía del Servicio de Material Genético del ICONA con un código de selección y se acompañaron datos complementarios de test de germinación que fueron muy útiles en los primeros momentos del estudio.

En el análisis de material vegetal infectado compuesto por plántulas no ha sido posible recoger el mismo número de elementos

muestrales en cada especie, debido al carácter subjetivo de tal elección, aunque el tamaño de la muestra es significativo.

Para conocer los agentes fúngicos implicados se realizaron aislamientos en tres medios microbiológicos de cultivo diferentes según la receta de sus respectivos autores:

Patata-Dextrosa-Agar (PDA), medio general, según la receta de ECHANDI (1971).

KOMADA (K), medio selectivo para *Fusarium* según la receta de KOMADA (1975). Este medio sirve también para que se desarrollen otras especies del mismo género.

PONCHET (P), medio selectivo para *Pythium* y *Phytophthora*, según la receta de PONCHET *et al.* (1972).

Para el análisis de la semilla se reparten 100 semillas de cada especie y procedencia diferente, en 10 placas de Petri por cada medio de cultivo. Para analizar las plántulas afectadas se seccionaron en tres zonas morfológicas bien diferenciadas: raíz, tallo y acícula, obteniendo porciones de cada zona con una longitud aproximada de 1,5 cm. que fueron sembradas en los mismos medios de cultivo anteriormente citados, procurando que el número de porciones por placa de Petri fuese el mismo.

Después de un período en bancada de laboratorio se realizaron las lecturas periódicas para determinar los hongos, junto a preparaciones microscópicas montadas en azul algodón y lactofenol de Amman.

Sustrato

Los componentes que se utilizan para la siembra (Turba rubia de sphagnum, Perlita expandida y Vermiculita) son analizados individualmente para conocer la densidad de inóculo y su estado sanitario a la hora de utilizarlos ya que son materiales habituales que proporcionan un soporte alimenticio y físico para el vivero forestal bajo invernadero.

Para el análisis de estos componentes se utilizaron tres procedimientos diferentes:

1.º **Técnica de dilución-suspensión:** para conocer la micoflora total a través de

concentraciones diferentes de los materiales componentes del sustrato con agua estéril (1/100, 1/1.000 y 1/10.000) sobre un medio microbiológico de agar-malta acidificado con ácido cítrico en el que se incorpora, en las placas de Petri, 1 ml. de cada suspensión por 10 ml de medio de cultivo, antes de que se solidifique el medio.

2.º **Adición de muestra del suelo al medio de cultivo KOMADA (K):** para conocer la flora Fusárica a través de cuatro repeticiones por muestra, previamente trituradas y desecadas de las que se calcula su peso seco para poder expresar los resultados en propágulo/gramo de suelo seco. Las placas de Petri con 15 ml. de medio de cultivo se cubren con los diferentes componentes.

En ambos casos se repiten tres veces los análisis para minimizar lo máximo posible el error que conllevan estos métodos de análisis y así a través de la ponderación estadística poder considerarlos válidos.

3.º **Trampa vegetal de pétalos de clavel:** para detectar la presencia de géneros *Pythium* o *Phytophthora* por dilución en agua destilada de una cantidad precisa de materiales del sustrato vertidos en placas de Petri en donde se colocan cinco pétalos de clavel inmaduro que captarán, en su caso, los esporangios de estos hongos.

Agua de riego

El agua de riego puede ser una fuente y un medio de expansión de propágulos fúngicos por lo que es necesario realizar un análisis biológico para conocer la posibilidad de infección, por ello se ha utilizado un medio microbiológico de patata-dextrosa-agar acidificado con ácido cítrico de la misma forma que la técnica de dilución-suspensión con agua destilada anteriormente citada en dos concentraciones distintas (1/10 y 1/100), incorporando 0,1 ml. de las distintas diluciones en 15 ml. de medio de cultivo por placa de Petri antes de que el medio se solidificase.

Se realizaron tres tomas de cada análisis para establecer una ponderación de los mismos y minimizar el error que conlleva el método de análisis empleado.

Análisis del ambiente aéreo del invernadero

Por último, conocer la micoflora dentro del invernadero y su distribución temporal durante el proceso de producción era muy interesante porque un porcentaje elevado de propágulos fúngicos en el aire, supone una vía de inóculo para las plantas y la permanencia de la enfermedad por reinfecciones sucesivas.

La colocación de placas de Petri abiertas con medios microbiológicos PDA y KOMADA, durante treinta minutos de forma equidistante entre los espacios de los contenedores, permite capturar los posibles propágulos que se encuentren en el aire que rodea las plántulas. La superficie que cubría cada «placa trampa» era de 2.146 dm².

Este análisis se realizó con una periodicidad mensual desde Mayo de 1992 hasta Abril de 1993, con lo que se cubría un año que coincidía con el tiempo de duración de la campaña de producción.

Pareció interesante el conocer las características climáticas en que se desarrollaban las plántulas dentro del invernadero por lo que durante un año completo se tomaron datos de temperaturas máximas, temperaturas mínimas junto a humedades relativas, para comprobar si las condiciones medioambientales influían en el desarrollo de la enfermedad.

RESULTADOS

Análisis de la semilla

Se analizaron un total de 2.700 semillas, dando un total de 3.905 colonias que pertenecían a 17 especies fúngicas diferentes junto a un porcentaje mínimo (0,41 %) de bacterias que no se llegaron a determinar.

A continuación aparecen los resultados por cada especie vegetal, acompañados de un **índice de contaminación (IC)** para establecer comparaciones entre resultados.

Comparando los índices de contaminación de las especies vegetales se puede comprobar que *P. sylvestris* es el que posee el más alto valor coincidiendo con la especie que presenta mayor número de hongos presentes en el estudio de la semilla.

Cuadro 1.-Micoflora total asociada a la semilla de *Pinus eldarica*

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Alternaria alternata</i>	10	2,39
<i>Botrytis cinerea</i>	5	1,19
<i>Paecilomyces variotti</i>	15	3,57
<i>Penicillium spp.</i>	276	65,71
<i>Rhizopus spp.</i>	102	24,29
<i>Trichoderma viride</i>	12	2,86
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 420		
N.º TOTAL DE SEMILLAS (S) = 300		
IC = C/S = 1.4		

Cuadro 2.—**Micoflora total asociada a la semilla de *Pinus halepensis***

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Penicillium spp.</i>	429	49,37
<i>Rhizopus spp.</i>	440	50,63
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 869		
N.º TOTAL DE SEMILLAS (S) = 600		
IC = C/S = 1.45		

Cuadro 3.—**Micoflora total asociada a la semilla de *Pinus pinaster***

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Alternaria alternata</i>	57	5,04
<i>Aspergillus niger</i>	4	0,35
BACTERIAS	8	0,71
<i>Botrytis cinerea</i>	3	0,27
<i>Fusarium oxysporum</i>	21	1,86
<i>Gliocladium roseum</i>	4	0,35
<i>Paecilomyces variotii</i>	130	11,50
<i>Penicillium spp.</i>	497	43,98
<i>Phoma spp.</i>	1	0,09
<i>Rhizopus spp.</i>	269	23,81
<i>Schizophyllum commune</i>	2	0,18
<i>Stemphylium botryosum</i>	4	0,35
<i>Trichoderma viride</i>	134	11,86
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 1.134		
N.º TOTAL DE SEMILLAS (S) = 900		
IC = C/S = 1.26		

Cuadro 4.—**Micoflora total asociada a la semilla de *Pinus sylvestris***

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Acremonium spp.</i>	26	1,75
<i>Alternaria alternata</i>	23	1,55
<i>Aspergillus flavus</i>	10	0,67
<i>Aspergillus niger</i>	24	1,62
BACTERIAS	8	0,54
<i>Botrytis cinerea</i>	5	0,34
<i>Fusarium moniliforme</i>	10	0,67
<i>Fusarium oxysporum</i>	10	0,67
<i>Paecilomyces variotii</i>	78	5,26
<i>Penicillium spp.</i>	768	51,82
<i>Phoma spp.</i>	1	0,07
<i>Rhizopus spp.</i>	336	22,67
<i>Sporothrix spp.</i>	5	0,34
<i>Stemphylium botryosum</i>	5	0,34
<i>Trichoderma viride</i>	129	8,70
<i>Trichothecium roseum</i>	44	2,97
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 1.482		
N.º TOTAL DE SEMILLAS (S) = 900		
IC = C/S = 1.65		

Análisis de la plántula infectada

El material fue recogido en las visitas al invernadero durante todo el año, eligiendo aquellas plántulas que presentaban síntomas de marchitamiento, caída en el sustrato, clorosis o puntisechado de la zonas verdes.

En total se analizaron: 52 plántulas de *Pinus eldarica*, 129 plántulas de *P. halepensis*, 110 plántulas de *P. pinaster* y 157 plán-

tulas de *P. sylvestris*, apareciendo un total de 4.165 colonias de 18 especies fúngicas diferentes.

Los resultados se expresan por especie vegetal y acompañados del **índice de contaminación (IC)** correspondiente.

P. sylvestris vuelve a ser la especie vegetal que presenta un índice de contaminación mayor al igual que coincide con que presenta una micoflora más amplia.

Cuadro 5.—Micoflora total asociada a la plántula de *Pinus eldarica*

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Alternaria alternata</i>	79	16,26
<i>Cladosporium herbarum</i>	40	8,23
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0,21
<i>Fusarium moniliforme</i>	24	4,95
<i>Fusarium oxysporum</i>	12	2,47
<i>Fusarium solani</i>	38	7,82
<i>Paecilomyces variotii</i>	97	19,97
<i>Penicillium spp.</i>	169	34,74
<i>Phoma spp.</i>	5	1,03
<i>Rhizopus spp.</i>	21	4,32
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 486		
N.º TOTAL DE PLANTULAS (P) = 52		
IC = C/P = 9.35		

Cuadro 6.—Micoflora total asociada a la plántula de *Pinus halepensis*

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Alternaria alternata</i>	212	21,97
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	0,10
BACTERIAS	2	0,20
<i>Cephalosporium spp.</i>	6	0,60
<i>Cladosporium herbarum</i>	17	1,76
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	5	0,50
<i>Epicoccum nigrum</i>	12	1,24
<i>Fusarium moniliforme</i>	22	2,28
<i>Fusarium oxysporum</i>	50	5,18
<i>Fusarium solani</i>	83	8,60
<i>Paecilomyces variotii</i>	320	33,16
<i>Penicillium spp.</i>	127	13,16
<i>Rhizopus spp.</i>	103	10,67
<i>Trichothecium roseum</i>	5	0,50
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 965		
N.º TOTAL DE PLANTULAS (P) = 129		
IC = C/P = 7.48		

Cuadro 7.—**Micoflora total asociada a la plántula de *Pinus pinaster***

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Alternaria alternata</i>	131	12,87
<i>Aspergillus flavus</i>	6	0,59
BACTERIAS	4	0,39
<i>Cladosporium herbarum</i>	132	12,97
<i>Epicoccum nigrum</i>	6	0,59
<i>Fusarium moniliforme</i>	28	2,75
<i>Fusarium oxysporum</i>	19	1,87
<i>Fusarium solani</i>	78	7,66
<i>Paecilomyces variotii</i>	12	1,18
<i>Penicillium spp.</i>	542	53,24
<i>Phoma spp.</i>	3	0,29
<i>Rhizopus spp.</i>	37	3,63
<i>Stemphylium botryosum</i>	20	1,96
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 1.018		
N.º TOTAL DE PLANTULAS (P) = 110		
IC = C/P = 9.25		

Cuadro 8.—**Micoflora total asociada a la plántula de *Pinus sylvestris***

Especie fúngica	N.º colonias	% total
<i>Acremonium spp.</i>	1	0,06
<i>Alternaria alternata</i>	204	12,03
<i>Aspergillus flavus</i>	9	0,53
<i>Aureobasidium pullulans</i>	20	1,18
BACTERIAS	3	0,17
<i>Cladosporium herbarum</i>	500	29,48
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	6	0,35
<i>Fusarium moniliforme</i>	22	1,30
<i>Fusarium oxysporum</i>	36	2,12
<i>Fusarium roseum</i>	22	1,30
<i>Fusarium solani</i>	261	15,39
<i>Paecilomyces variotii</i>	5	0,29
<i>Penicillium spp.</i>	491	28,95
<i>Phoma spp.</i>	20	1,18
<i>Rhizopus spp.</i>	86	5,07
<i>Stemphylium botryosum</i>	10	0,59
N.º TOTAL DE COLONIAS (C) = 1.696		
N.º TOTAL DE PLANTULAS (P) = 157		
IC = C/P = 10.80		

Análisis de sustratos

Se han contabilizado un total de 2.443 colonias en la Perlita, 2.548 colonias en la Turba y 2.164 colonias en la Vermiculita, en el análisis para conocer la micoflora total por el método de disolución-suspensión.

En el análisis para conocer la presencia de *Pythiaceas* se utilizaron 150 pétalos de clavel sin conseguir detectar ningún propágulo de dichos hongos.

A continuación se presentan los resultados de los análisis efectuados, tanto los

relacionados con la micoflora total como los realizados para conocer la flora fusárica.

La elección de la concentración más representativa debe cumplir que presente el mayor número de propágulos de los diferentes hongos, aunque ello excluyese alguna especie fúngica que se hubiese determinado en otra concentración (TELLO & LACASA, 1990), por lo que en los tres materiales aislados se designa la concentración 1/1000 por ser la que cumple tal requisito.

Cuadro 9.—**Micoflora total de turba analizada por el método de Dilución-Suspensión**
(se expresa en propágulos/gr. de turba)

Especies fúngicas	($\times 10^3$)
<i>Acremonium spp.</i>	1,33
<i>Alternaria alternata</i>	12,67
<i>Aspergillus flavus</i>	2,66
<i>Aspergillus niger</i>	1,67
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	3
<i>Paecilomyces variotii</i>	5,67
<i>Penicillium spp.</i>	13,33
<i>Rhizopus spp.</i>	48
<i>Trichoderma viride</i>	151,67

Cuadro 10.—**Micoflora fusárica por el método de medio de cultivo Komada**

ESPECIE		TURBA
Muestra	Especie fúngica	Propágulo/gramo
Muestra 1	<i>Fusarium moniliforme</i>	30,819 \pm 4,892
	<i>Fusarium oxysporum</i>	47,540 \pm 5,195
	<i>Fusarium solani</i>	17,359 \pm 5,637

Cuadro 11.—**Micoflora total de perlita analizada por el método de Dilución-Suspensión**
(se expresa en propágulos/gr. de perlita)

Especies fúngicas	(× 10³)
<i>Acremonium spp.</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Fusarium solani</i>	0,67
<i>Paecilomyces variotii</i>	1,67
<i>Penicillium spp.</i>	2,33
<i>Rizopus spp.</i>	3,33
<i>Trichoderma viride</i>	346,67

Cuadro 12.—**Micoflora fusárica por el método de medio de cultivo Komada**

ESPECIE		PERLITA
Muestra	Especie fúngica	Propágulo/gramo
Muestra 1	<i>Fusarium oxysporum</i>	43,375 ± 13,312
	<i>Fusarium solani</i>	54,375 ± 13,326

Cuadro 13.—**Micoflora total de vermiculita analizada por el método de Dilución-Suspensión**
(se expresa en propágulos/gr. de vermiculita)

Especies fúngicas	(× 10³)
<i>Acremonium spp.</i>	0,33
<i>Alternaria alternata</i>	0,67
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,67
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	4,33
<i>Penicillium spp.</i>	5,67
<i>Rizopus spp.</i>	1
<i>Trichoderma viride</i>	206,67

Cuadro 14.—**Micoflora fusárica por el método de medio de cultivo Komada**

ESPECIE		VERMICULITA
Muestra	Especie fúngica	Propágulo/gramo
Muestra 1	<i>Fusarium moniliforme</i>	29,298 ± 13,033
	<i>Fusarium oxysporum</i>	98,586 ± 45,648

Análisis del agua de riego

Tomando muestras en dos puntos diferentes como es la salida de la bomba de impulsión conectada al pozo y en un microdifusor de riego en el invernadero, podemos conocer qué agentes fúngicos pueden ser transportados por el agua.

Se contabilizaron 904 colonias en el análisis del agua de pozo, 998 colonias en el análisis del agua del microdifusor del Ala I del invernadero y 1.367 colonias en el análisis del agua arrojada por el microdifusor del Ala II.

A continuación aparecen los datos ponderados tanto del agua tomada del pozo como de la que regaba las dos alas del invernadero.

Cuadro 15.—**Micoflora total en el agua de pozo. Toma media concentr. 1/10**

Especie fúngica	N.º colonias ($\times 10$)
<i>Aspergillus niger</i>	1,5
<i>Cephalosporium spp.</i>	10,7
<i>Penicillium spp.</i>	31,3
<i>Rhizopus spp.</i>	3,3
<i>Trichoderma viride</i>	31,7

Cuadro 16.—**Micoflora total en el agua de pozo. Toma media concentr. 1/100**

Especie fúngica	N.º colonias ($\times 10^2$)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1
<i>Cephalosporium spp.</i>	4,7
<i>Penicillium spp.</i>	64,7
<i>Rhizopus spp.</i>	2,3
<i>Trichoderma viride</i>	150,7

Cuadro 17.—**Micoflora total en el agua de riego. Toma media concentr. 1/10. Invernadero. Ala I**

Especie fúngica	N.º colonias ($\times 10$)
<i>Alternaria alternata</i>	1
<i>Cladosporium herbarum</i>	9
<i>Fusarium moniliforme</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,3
<i>Penicillium spp.</i>	87,7
<i>Rhizopus spp.</i>	11
<i>Trichoderma viride</i>	120

Cuadro 18.—**Micoflora total en el agua de riego. Toma media concentr. 1/100. Invernadero. Ala I**

Especie fúngica	N.º colonias ($\times 10^2$)
<i>Alternaria alternata</i>	0,7
<i>Cladosporium herbarum</i>	5,3
<i>Fusarium moniliforme</i>	1,3
<i>Fusarium oxysporum</i>	1
<i>Penicillium spp.</i>	54
<i>Rhizopus spp.</i>	6,7
<i>Trichoderma viride</i>	46

Cuadro 19.—**Micoflora total en el agua de riego. Toma media concentr. 1/10. Invernadero. Ala II**

Especie fúngica	N.º colonias (× 10)
<i>Alternaria alternata</i>	1
<i>Cladosporium herbarum</i>	12,3
<i>Fusarium moniliforme</i>	2,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	2
<i>Penicillium spp.</i>	113,3
<i>Rhizopus spp.</i>	23
<i>Trichoderma viride</i>	160

Cuadro 20.—**Micoflora total en el agua de riego. Toma media concentr. 1/100. Invernadero Ala II**

Especie fúngica	N.º colonias (× 10 ²)
<i>Alternaria alternata</i>	0,7
BACTERIAS	25,7
<i>Cladosporium herbarum</i>	6,7
<i>Fusarium moniliforme</i>	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,3
<i>Penicillium spp.</i>	75
<i>Rhizopus spp.</i>	12
<i>Trichoderma viride</i>	41,7

Análisis en el ambiente aéreo del invernadero

El número total de colonias capturadas es de 6.994 en que se han identificado 20 especies fúngicas en el aire que rodea la plántula

por lo que se convierte en una fuente de inóculo con grandes posibilidades de contagio y reinfección.

A continuación se exponen los resultados en las dos alas del invernadero que producían plántulas de pino.

Cuadro 21.—**Micoflora total en el ambiente aéreo del invernadero. Ala I**

Especie fúngica	N.º colonias
<i>Acremonium spp.</i>	30
<i>Alternaria alternata</i>	413
<i>Aspergillus niger</i>	10
<i>Aurebasidium pullulans</i>	500
BACTERIAS	90
<i>Botrytis cinerea</i>	11
<i>Cephalosporium spp.</i>	24
<i>Cladosporium herbarum</i>	947
<i>Epicoccum nigrum</i>	44
<i>Fusarium moniliforme</i>	104
<i>Fusarium oxysporum</i>	175
<i>Fusarium solani</i>	39
<i>Nigrospora spp.</i>	4
<i>Paecilomyces variotii</i>	658
<i>Penicillium spp.</i>	306
<i>Rhizopus spp.</i>	45
<i>Stemphylium botryosum</i>	53
<i>Trichoderma viride</i>	132

Cuadro 22.—**Micoflora total en ambiente aéreo del invernadero. Ala II**

Especie fúngica	N.º colonias
<i>Acremonium spp.</i>	25
<i>Alternaria alternata</i>	389
<i>Aurebasidium pullulans</i>	410
BACTERIAS	113
<i>Botrytis cinerea</i>	15
<i>Cephalosporium spp.</i>	34
<i>Cladosporium herbarium</i>	867
<i>Epicoccum nigrum</i>	38
<i>Fusarium moniliforme</i>	105
<i>Fusarium oxysporum</i>	122
<i>Fusarium solani</i>	50
<i>Gliocladium roseum</i>	2
<i>Nigrospora spp.</i>	7
<i>Ostrachoderma spp.</i>	52
<i>Paecilomyces variotii</i>	618
<i>Penicillium spp.</i>	404
<i>Rhizopus spp.</i>	89
<i>Stemphylium botryosum</i>	23
<i>Trichoderma viride</i>	248
<i>Trichothecium roseum</i>	1

DISCUSION

En la actualidad se está procediendo a la realización de inoculaciones artificiales para determinar el comportamiento patogénico de los hongos aislados; por tanto, la distinción del carácter saprófito o patógeno que se utiliza en este artículo corresponde a la información recogida de la bibliografía extranjera manejada.

Análisis de la semilla

La información obtenida de los análisis de la semilla de *Pinus eldarica* (Cuadro 1) es nueva para España, debido a su reciente utilización o cultivo por parte del CNMGF. «El Serranillo». Entre las seis especies de hongos que se han detectado, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea* son patógenos, según la bibliografía consultada, mientras *Paecilomyces variotii*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.* y *Trichoderma viride*, son considerados saprófitos.

Es necesario mencionar el interés que suscitó el conocer que se estaba produciendo

esta especie debido a la importancia que pudiese tener el hecho de utilizar semilla de importación en la introducción en España de nuevas enfermedades por parte de material reproductor contaminado.

Las semillas de *Pinus halepensis* (Cuadro 2) sólo presentan dos micetes (*Penicillium spp.* y *Rhizopus spp.*) pero no porque su carácter sea típicamente saprofitico no deben ser considerados menos importantes ya que éstos mismos son responsables de bajas en almacenaje.

La micoflora de las semillas de *Pinus pinaster* (Cuadro 3) está constituida por doce especies de hongos siendo las más representadas las saprófitas *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Trichoderma viride* y *Paecilomyces variotii*. Entre los patógenos se encuentran *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Dos citas nuevas en España sobre esta especie son *Gliocladium roseum* y *Schizophyllum commune*.

Las semillas de *Pinus sylvestris* (Cuadro 4) son las que presentan mayor variedad fúngica con quince especies de hongos. Entre los patógenos aparecen *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* y *F.*

oxysporum. Parásito oportunista como *Stemphylium botryosum*. Saprófitos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Phoma spp.* y *Trichothecium roseum*. Citas nuevas en España sobre semilla, en esta especie son *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces variotii* y *Sporothrix spp.*

Por tanto, en general la micoflora de la semilla la componen dos grupos diferenciados:

- Saprófitos que no tienen un poder infeccioso de forma intrínseca, pueden llegar a invadir testa y cuello radicular de la plántula, provocándole debilitamiento e incluso asfixia (Fig. 4).

- Parásitos oportunistas y/o parásitos epifitos con posibilidad de actuar en la joven raíz (Fig. 5).

Estos resultados se resumen en la Figura 6.

Análisis de la planta infectada

En *Pinus eldarica* (Cuadro 5) se determinan seis citas nuevas más en España en donde *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani*, son patógenos y *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum* y *Phoma spp.* son saprófitos, según la bibliografía consultada.

Se observan diferencias entre la micoflora de la semilla y la de la plántula. Así, en *Pinus halepensis* (Cuadro 6) se determinan once nuevos hongos con respecto al análisis de su semilla. Aparecen cinco patógenos, *Alternaria alternata*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Entre los saprófitos, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* o *Trichothecium roseum*.

En *Pinus pinaster* (Cuadro 7) se han identificado cinco hongos nuevos con respecto al análisis de la semilla. Hongos con capacidad de dañar a las plántulas como *Fusarium moniliforme* y *F. solani*. Saprófitos como *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum* o *Epicoccum nigrum*.

En *Pinus sylvestris* (Cuadro 8) se encuentra de nuevo la mayor diversidad en la micoflora acompañante. Se han determinado

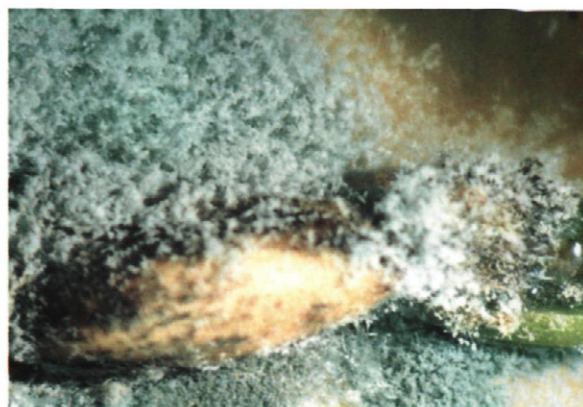


Fig. 4.—Micelio de *Penicillium spp.*, invadiendo la testa y cuello radicular de una plántula (* 10).

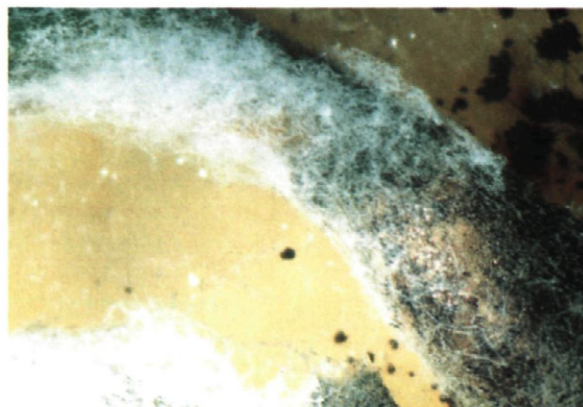
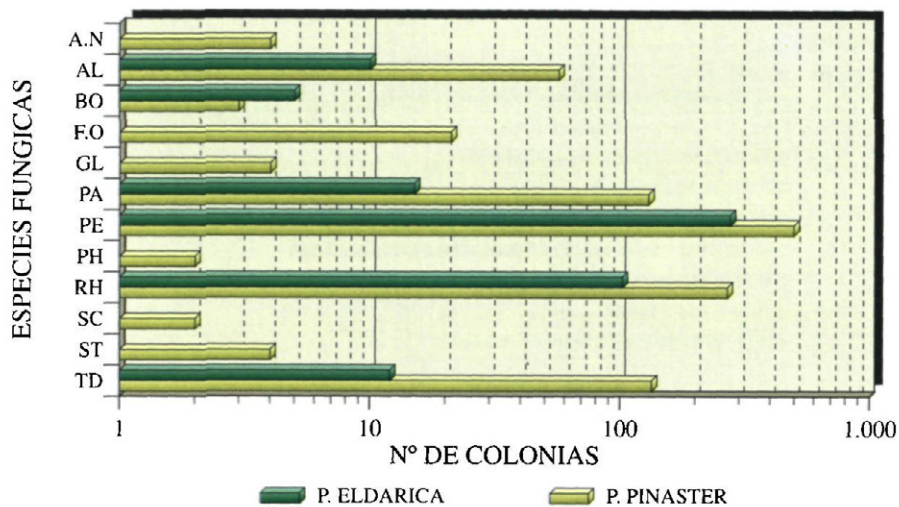


Fig. 5.—Micelio de *Fusarium moniliforme* invadiendo las partes verdes de una plántula recién emergida (* 10).

cinco nuevas especies fúngicas con respecto al análisis de la semilla. Patógenos como *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium roseum*, *F. solani* y *Stemphylium botryosum*. Saprófitos como *Aureobasidium pullulans* y *Acremonium spp.*

A tenor de los resultados hay que resaltar el hecho de la mayor presencia de especies fúngicas con relación a los presentes en la semilla tal y como se pudo observar sobre *P. halepensis*.

Los datos aparecen representados en la Figura 7.



- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| AC - Acremonium spp. | AL - Alternaria alternata |
| A.F - Aspergillus flavus | A.N - Aspergillus niger |
| BO - Botrytis cinerea | F.M - Fusarium moniliforme |
| F.O - Fusarium oxysporum | GL - Gliocladium roseum |
| PA - Paecilomyces variotii | PE - Penicillium spp. |
| PH - Phoma spp. | RH - Rhizopus spp. |
| SC - Schizophyllum commune | SP - Sporothrix spp. |
| ST - Stemphylium botryosum | TD - Trichoderma viride |
| TT - Trichothecium roseum | |

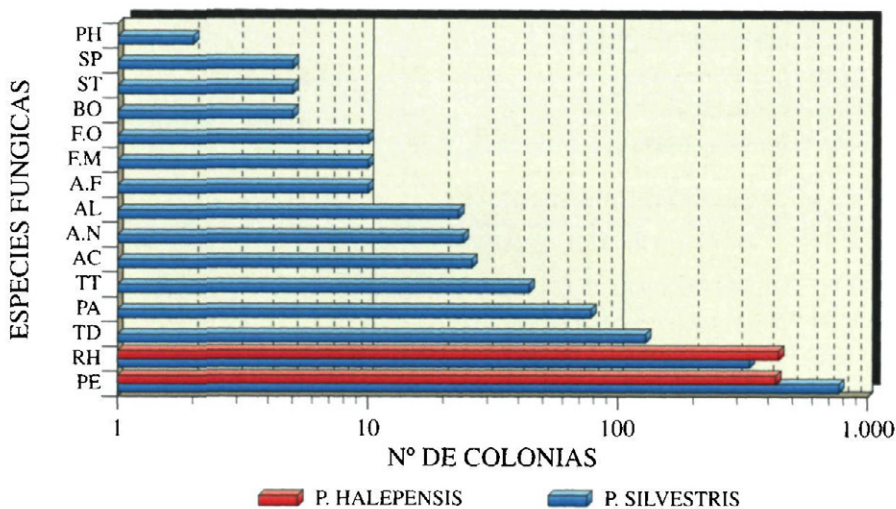
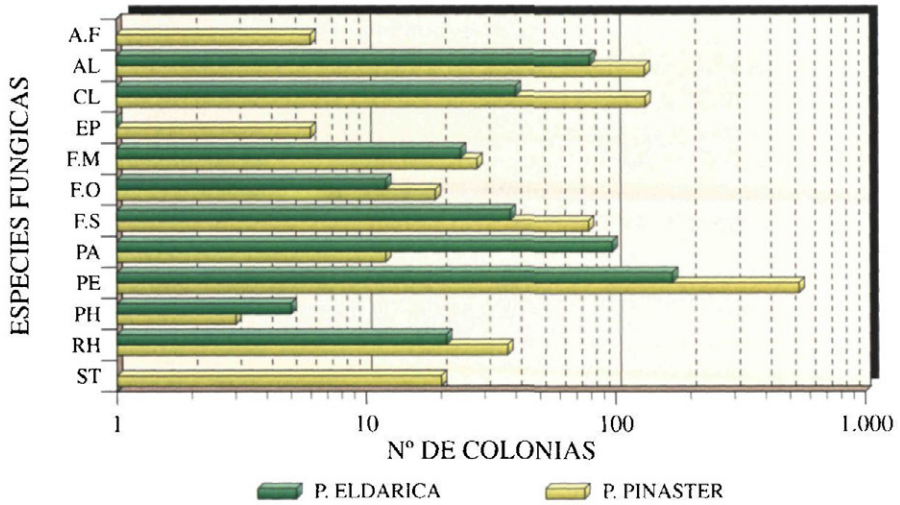


Fig. 6.-Micosis en semilla



AC - Acremonium spp.	AL - Alternaria alternata
A.F - Aspergillus flavus	AU - Aureobasidium pullulans
CE - Cephalosporium spp.	CL - Cladosporium herbarum
CY - Cylindrocarpon destructans	EP - Epicoccum nigrum
F.M - Fusarium moniliforme	F.O - Fusarium oxysporum
F.R - Fusarium roseum	F.S - Fusarium solani
PA - Paecilomyces variotii	PE - Penicillium spp.
PH - Phoma spp.	RH - Rhizopus spp.
ST - Stemphylium botryosum	TT - Trichothecium roseum

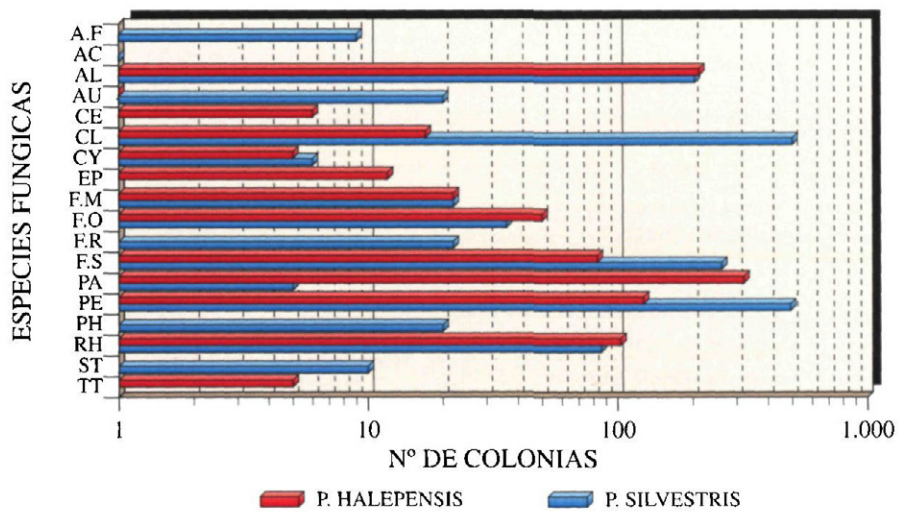


Fig. 7.-Micosis en plántula.

Análisis de sustratos

El estudio fúngico de la Turba (Cuadro 9) arroja diez especies fúngicas, entre las cuales hay que señalar dentro de los patógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, y dentro de los saprófitos *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium spp.* y *Trichoderma viride*. En el análisis para conocer la micoflora fusárica a través del medio Komada (Cuadro 10) aparecen otros dos patógenos: *Fusarium moniliforme* y *F. solani*, según bibliografía.

En la Perlita (Cuadro 11) se determinan siete hongos de los cuales dos son patógenos, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, junto a saprófitos como *Acremonium spp.*, *Paecilomyces variotii* o *Trichoderma viride*, en el análisis de micoflora total por dilución-suspensión. En el análisis selectivo para *Fusarium* (Cuadro 12) se determinan las mismas especies que en análisis anteriormente mencionado.

En la Vermiculita (Cuadro 13), ocho especies fúngicas aparecen, siendo patógenas *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* y saprófitas *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium spp.* o *Trichoderma viride*, en el análisis de micoflora total por dilución-suspensión. En el análisis selectivo para *Fusarium* (Cuadro 14) se determina además *Fusarium moniliforme*.

El análisis realizado para detectar Pythiaceas da como resultado que ningún componente del sustrato presentaba ni *Pythium* ni *Phytophthora*.

A continuación aparece la representación gráfica de dichos datos (Figura 8).

Análisis del agua de riego

En el análisis de la salida de la bomba (Cuadros 15 y 16) no se determinan hongos patógenos, apareciendo saprófitos como *Au-*

reobasidium pullulans, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.* y *Trichoderma viride*.

En el análisis del microdifusor, que se realiza en el ala I del invernadero (Cuadros 17 y 18) y en el ala II (Cuadros 19 y 20) aparecen tres patógenos como son *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum*, junto a saprófitos como *Cladosporium herbarum* o *Trichoderma viride*.

Los datos aparecen expresados gráficamente (Figura 9).

Análisis en el ambiente aéreo del invernadero

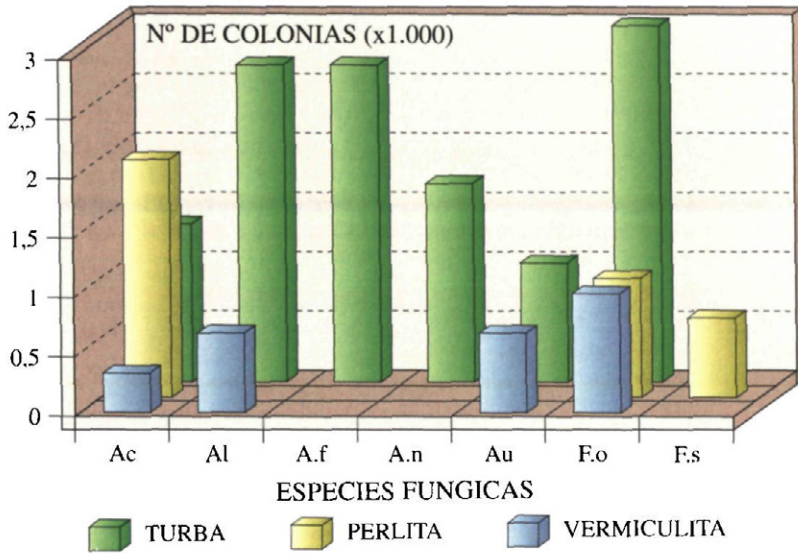
Tanto en el ala I del invernadero (Cuadro 21), como en el ala II (Cuadro 22) aparecen patógenos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *Stemphylium botryosum*, junto a saprófitos como *Nigrospora spp.* y *Ostrachoderma spp.*, especies nuevas con relación al resto de saprófitos aislados durante los análisis realizados durante el año en el invernadero.

En las instalaciones los valores térmicos y de humedad relativa fueron tomados en las dos alas del invernadero, siendo los siguientes:

– El ala I, presenta un rango térmico anual entre los 24 °C. de máxima y los 9 °C. de mínima, teniendo valores extremos mensuales de 34 °C. en Julio y 2 °C. en Diciembre. Con respecto a la humedad relativa anual, el rango varía entre el 94% y el 63%.

– El ala II, presenta un rango térmico anual entre los 26 °C. de máxima y los 10 °C. de mínima, con valores extremos mensuales de 32 °C. en Julio y 3 °C. en Enero. La humedad relativa anual oscila entre el 94% y el 61%.

Se ha expresado gráficamente los datos globales a ambas alas (Figura 10).



Ac - Acremonium spp.	F.o - Fusarium oxysporum
Al - Alternaria alternata	F.s - Fusarium solani
A.f - Aspergillus flavus	Pa - Paecilomyces variotii
A.n - Aspergillus niger	Pe - Penicillium spp.
Au - Aureobasidium pullulans	Rh - Rhizopus spp.
	Td - Trichoderma viride

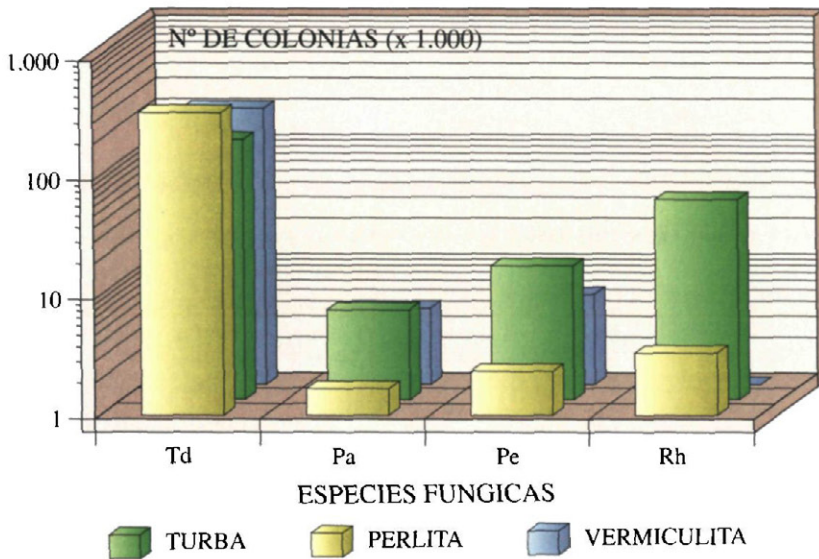
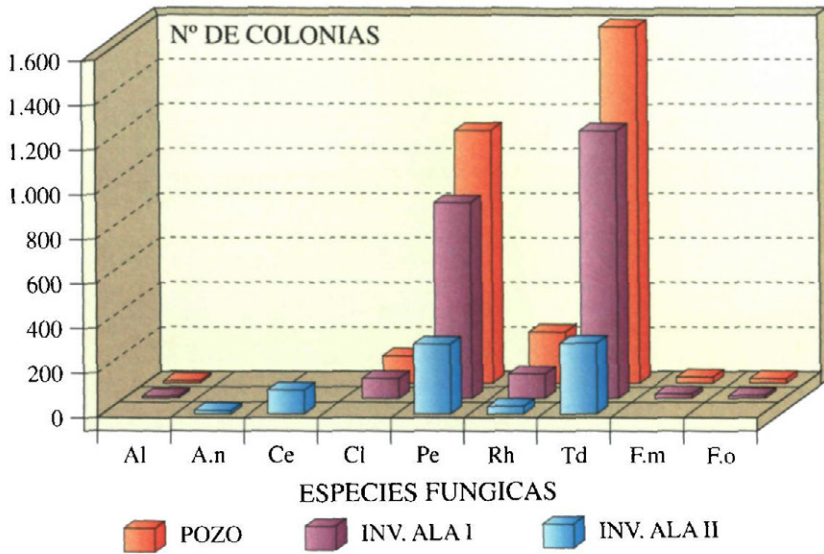


Fig. 8.-Hongos en los materiales del suelo
Anal. cualitativo (Conc. 1/1000)



Al - <i>Alternaria alternata</i>	F.m - <i>Fusarium moniliforme</i>
A.n - <i>Aspergillus niger</i>	F.o - <i>Fusarium oxysporum</i>
Au - <i>Aureobasidium pullulans</i>	Pe - <i>Penicillium spp.</i>
Ce - <i>Cephalosporium spp.</i>	Rh - <i>Rhizopus spp.</i>
Cl - <i>Cladosporium herbarum</i>	Td - <i>Trichoderma viride</i>

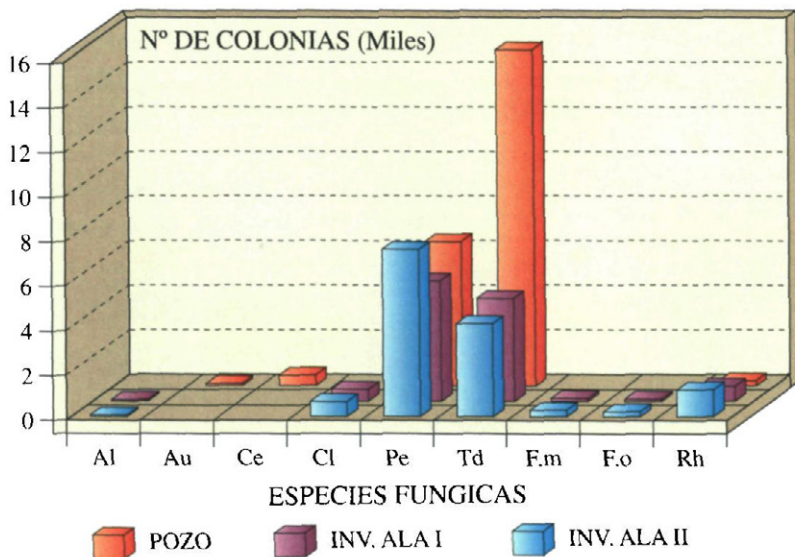
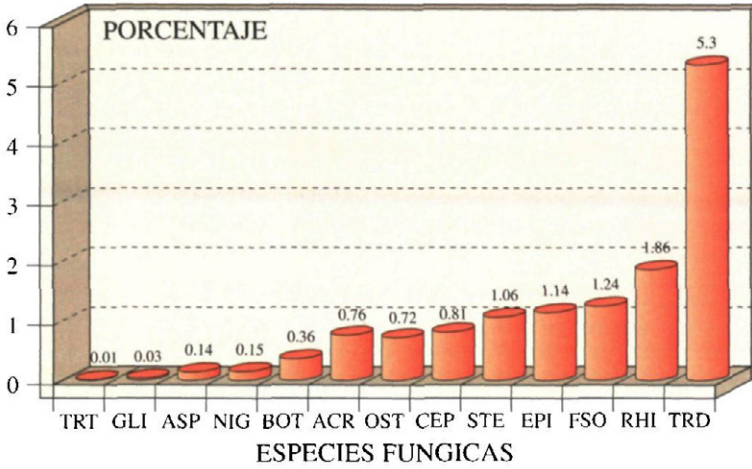


Fig. 9.-Hongos en el agua
Concentración 1/10



ACR - Acremonium spp.	FSO - Fusarium solani
ALT - Alternaria alternata	GLI - Gliocladium roseum
ASP - Aspergillus niger	NIG - Nigrospora spp.
AUR - Aureobasidium pullulans	OST - Ostrachoderma spp.
BAC - BACTERIAS	RHI - Rhizopus spp.
BOT - Botrytis cinerea	STE - Stemphylium botryosum
CEP - Cephalosporium spp.	PAE - Paecilomyces variotii
CLA - Cladosporium herbarum	PEN - Penicillium spp.
EPI - Epicoccum nigrum	TRD - Trichoderma viride
FMO - Fusarium moniliforme	TRT - Trichothecium roseum
FOX - Fusarium oxysporum	

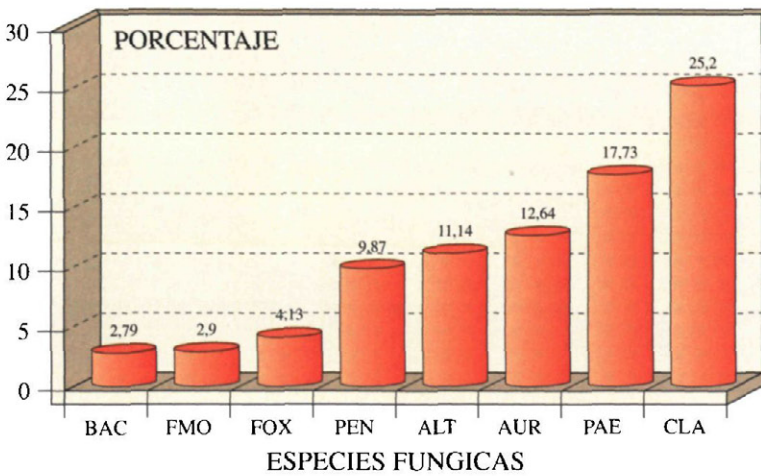


Fig. 10.-Ambiente en el invernadero
Porcentaje de hongos (%)

CONCLUSIONES

Es preciso, en este aspecto, tener presente el primer párrafo expresado en el apartado de Discusión.

A tenor de los resultados obtenidos, se llega a la conclusión que los agentes causantes del « **Damping-off** » en estas instalaciones pertenecen a los Fusaria, siendo *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme* los principales responsables debido a su carácter altamente parasitario.

F. oxysporum, hongo cosmopolita con un amplio rango de hospedadores, puede llegar a causar síntomas mortales a los pocos días, en los ensayos de patogenicidad que se realizan para demostrar su habilidad parasitaria (KUBIKOVA, 1968; PERRIN, 1990). Esta especie forma parte de la Sección Elegans, que dentro de los Fusaria son los patógenos más dañinos en cualquier tipo de cultivo, ya sea agrícola o forestal, desarrollando más de 120 formas especiales y razas (BLOOMBERG, 1979; TELLO, 1990).

F. moniliforme, también es capaz de provocar podredumbres radiculares nada más emerger la radícula por la testa de la semilla (MASON & VAN ARSDEL, 1978; HUANG & KUHLMAN, 1990).

En España, según estudios realizados (MUÑOZ, 1991), debe ser tenido en cuenta por la proporción en que aparece y por la capacidad de supervivencia de sus propágulos en materiales carentes de cualquier alimento sin poseer ningún cuerpo de resistencia como clamidosporas (TELLO & LACASA, 1990).

Cylindrocarpon destructans y *Botrytis cinerea*, son agentes infecciosos importantes (PERRIN & GAUTHERON, 1985) pero debido a su representación mínima en este estudio no parecen ser el principal problema en el CNMGF «El Serranillo».

Alternaria alternata es capaz de producir muerte por podredumbre radicular en los ensayos de patogenicidad (MITTAL & WANG, 1987), pero debido a la facilidad que tiene para colonizar zonas muertas su comportamiento más habitual es el de saprófito, por

lo que no es posible afirmar que sea causante de la enfermedad en solitario.

Por último, se aíslan tres especies fúngicas que debido a su actividad parasitaria reducida son considerados parásitos oportunistas:

Fusarium roseum, *F. solani* y *Stemphylium botryosum* producen decoloraciones pardo-rojizas y ralentizaciones de la radícula, aunque el porcentaje de muertes es menor al 10% en ensayos de patogenicidad (HUANG & KUHLMAN, 1990; PAWUK, 1978).

Junto a estos patógenos, no se debe olvidar el alto porcentaje de colonias de saprófitos en la semilla, *Penicillium spp.* y *Rhizopus spp.*, que denota problemas en la conservación y almacenamiento, pudiendo llegar a provocar pérdidas germinativas por aborto del embrión (CATALÁN, 1977; NEERGAARD, 1979).

Con relación al análisis de sustratos, se ha comprobado que la utilización de material infectado es una fuente de inóculo adicional que favorece la propagación y reinfección de la enfermedad en los invernaderos. La presencia de *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme* en productos carentes de sustancias orgánicas debe incentivar el uso más asiduo de sistemas desinfectantes, inmediatamente antes de realizar la siembra o la utilización de materiales con una capacidad menor de contaminación.

El control periódico del agua utilizada para el riego sirve para conocer la presencia de un determinado grupo de hongos pertenecientes al Orden Peronosporales, *Pythium* y *Phytophthora*, con un alto potencial de infección bien conocido en ataques en viveros. Además la presencia de los llamados *Hyphomycetes acuáticos*, entre los que se encuentran hongos como *Alternaria alternata*, *Botrytis spp.*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium spp.* o *Verticillium spp.*, con capacidad parasitaria y gran facilidad para desarrollarse en contacto con el agua, en un momento de su ciclo vital, hace necesario que se realicen tales análisis para prevenir que sea fuente de infección adicional (LOCHQUIN, 1984; FISHER *et al.*, 1991).

Las condiciones favorables que presenta en el invernadero tanto de temperatura y humedad relativa, debido a que se encuentra en un rango de valores óptimos (entre 20 °C. y 30 °C. para la temperatura y entre 90% y 95% de humedad relativa), hacen que se desarrolle una micoflora amplia en que se encuentran saprófitos y agentes patógenos citados anteriormente. La presencia en el aire de conidios y estructuras miceliarias de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* o *Stemphylium botryosum*, junto al de otros agentes, indica que es necesario extremar la limpieza o asepsia de las instalaciones para paliar al máximo que no se produzca una reinfección en las plántulas sanas.

La conclusión final que surge del presente estudio, opinión generalizada en el ámbito

de la Patología Vegetal (MITTAL *et al.*, 1987), es la necesidad de realizar análisis fitosanitarios rutinarios en los lotes de semilla y controles de las plántulas durante su crecimiento. Estas medidas pueden permitir la rápida identificación de los patógenos y en su caso poner en marcha medidas urgentes para evitar las importantes pérdidas a que da lugar el «Damping-off» en la producción forestal.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a D. Juan L. Peñuelas Rubira, Director del Centro Nacional de Mejora Genética Forestal «El Serranillo» (ICONA) y a todo el personal la colaboración prestada.

ABSTRACT

SOLDEVILLA, C., 1995: Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**(1): 87-109.

Damping-off is considered the phytopathologic complex that produce more losses in forest nurseries and greenhouses. Possibility infections ways, differents analysis methods and fungus species isolated on seedlings of pine species, under greenhouse conditions, are studied in this project.

Key words: Damping-off, *Pinus*, Greenhouse.

REFERENCIAS

- ABREU, M. J. y NOTARIO, A., 1986: Micosis en los viveros forestales. *TRIA*, **430**: 71-74.
- BENITO MARTÍNEZ, J. y TORRES JUAN, J., 1965: *Enfermedades de las coníferas españolas*. MAPA (Ins. Nac. Invest. y Exper.), 95 pp.
- BLOOMBERG, W. J., 1979: A model of Damping-off and Root rot of Douglas-fir seedlings caused by *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **69**: 74-81.
- CATALÁN, G., 1977: *Semillas de árboles y arbustos forestales*. MAPA, Ser. Monogr. 17, ICONA, 392 pp.
- ECHANDI, E., 1971: *Manual de laboratorio para fitopatología*. Ed. Herreros Hnos., Mexico, 58 pp.
- FISHER, P. J.; PETRINI, O. y WEBSTER, J., 1991: Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of *Alnus glutinosa*. *Mycol. Res.*, **95**: 543-547.
- HUANG, J. W. y KUHLMAN, E. G., 1990: Fungi associated with Damping-off of Slash pine seedlings in Georgia. *Plant Diseases*, **71**: 27-30.
- KOMADA, H., 1975: Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.*, **8**: 114-125.
- KUBIKOVA, J., 1968: *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. A dominant fungus species on the root-surface of woody plant seedlings. *Plant and Soil*, **28**: 306-311.
- LOCQUIN, M., 1984: *Mycologie générale et structurale*. Ed. Masson, Paris, 551 pp.
- MASON, G. N. y VAN ARSDEL, E. P., 1978: Fungi associated with *Pinus taeda* seed development. *Plant Diseases Reporter*, **62**: 864-867.

- MITTAL, R. K. y WANG, B. S., 1987: Fungi associated with seeds of eastern white pine and white spruce during cone processing and seed extraction. *Can. J. Forest Research*, **17**: 1026-1034.
- MITTAL, R. K.; SINGH, P. y WANG, B. S., 1987: Botrytis: a hazard to reforestation. *Eur. J. For. Pathol.*, **17**: 369-384.
- MUÑOZ, M.^a C., 1991: *Estudio de las micosis en vivero de coníferas*. Tesis Doctoral. U. Complutense, Madrid. 620 pp.
- NEERGAARD, P., 1979: *Seed Pathology*. Ed. Mac Millan. London, 839 pp.
- PAWUK, W. H., 1978: Damping-off of container-grown logleaf pine seedlings by seedborne Fusaria. *Plant Diseases*, **62**: 82-84.
- PERRIN, R., 1990: Enfermedades causadas por *Fusarium* spp. a las plantas forestales. *Phytoma España*, **18**: 47-50.
- PERRIN, R. y GAUTHERON, N., 1985: La fonte des semis en pépinières forestières et prévision des risques épidémiques. 25.^e Colloque Soc. Franc. Phytopa.: 108-125.
- PONCHET, J.; RICCI, P.; ANDREULI, C. y AUGÉ, G., 1972: Méthodes selectives d'isolement du *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica* (Dastur) warther à partir du sol. *Ann. Phytopathol.*, **4**: 97-108.
- TELLO, J. C. y LACASA, A., 1990: *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (Fusariosis vascular del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Bol. Sanidad Vegetal*. Fuera de serie **19**, 190 pp.
- TELLO, J. C., 1990: Especificidad parasitaria en el género *Fusarium*. *Phytoma España*, **20**: 47-51.
- TORRES JUAN, J., 1959: Enfermedad de las plantitas de Vivero. *Bol. Ser. Plagas For.*, **2**: 69-74.

(Aceptado para su publicación: 7 abril 1994)