

## Micoflora encontrada en semillas certificadas de *Pinus* spp. de diferentes regiones de procedencia en España

R. Beltrán (INIA-Centro de Evaluación de Variedades de Valencia, Valencia).

M. Naya y A. Aguado (Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales "Alaquàs", Alaquàs, Valencia).

Entre 2008 y 2011 se analizaron distintos lotes de semillas de *Pinus halepensis*, *P. pinaster* y *P. pinea* para proceder al diagnóstico de *Fusarium circinatum*, uno de los principales patógenos de cuarentena de dichas especies. Todos los lotes resultaron negativos a dicho hongo, sin embargo se identificaron diversos hongos de tipo saprófito, entre los que destacan los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*, así como otras especies del género *Fusarium*. La información obtenida en estos aislamientos puede ser útil para la posterior aplicación de la misma metodología.

### INTRODUCCIÓN

Según la normativa vigente, para la obtención de semilla certificada de diferentes especies de pino y previamente a su comercialización, es obligatorio proceder al diagnóstico de *Fusarium circinatum*, uno de los principales patógenos de cuarentena descritos en España afectando a *Pinus* spp. Lotes de piñas procedentes de diversas Comunidades Autónomas, son estudiados según el programa nacional de erradicación y control de *F. circinatum*, que obliga al análisis de la semilla. Los resultados obtenidos en estos análisis suelen ser, afortunadamente, negativos a este patógeno, pero en cambio es posible aislar otras especies fúngicas, generalmente de carácter saprófito.

Desde 2008 hasta 2011 se analizaron 50 lotes de semilla de *Pinus pinaster*, 9 lotes de *P. pinea* y 8 lotes de *P. halepensis* procedentes de siete Comunidades Autónomas (Cuadro 1), cuya piña había sido procesada en el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales (CNRGF) "Alaquàs" (Alaquàs, Valencia). Cada lote de semilla de las especies sensibles a la enfermedad, previamente a su comercialización, debe ir acompañado del diagnóstico sobre *F. circinatum*, uno de los principales patógenos de cuarentena descritos en España afectando a *Pinus* spp.

El método consistió en la toma de una muestra representativa de 500 semillas para cada lote, las cuales se sembraron en medios de cultivo PDAS y KOMADA (250 semillas por medio) y se incubaron a 25°C en oscuridad. Las colonias que fueron creciendo se replicaron a medios PDA y SNA, observándose posteriormente las características macroscópicas y microscópicas de cada una de dichas colonias, para proceder a su identificación a nivel de género y/o especie.

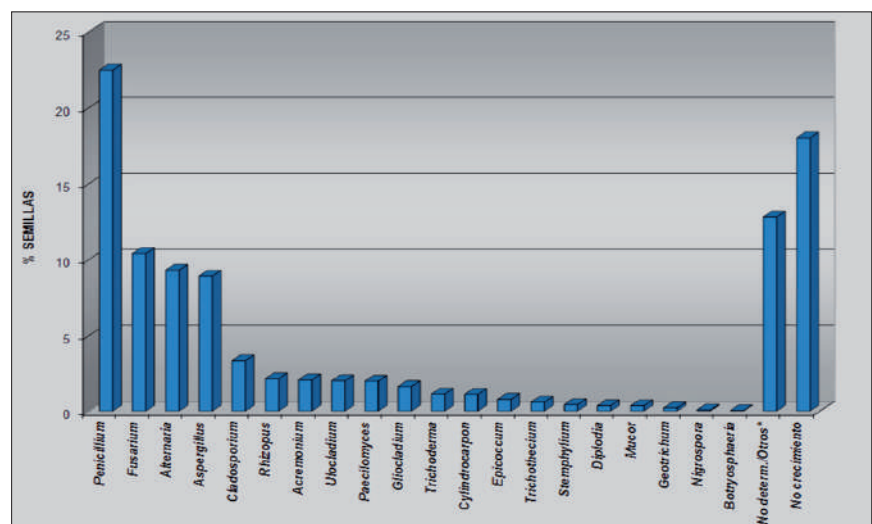


Figura 1. Porcentaje obtenido de los diferentes géneros fúngicos aislados en el total de semillas estudiadas.

Los resultados totales de las 33.500 semillas del total no creció ninguna colonia. Respecto a los muestradas aparecen en la Figura 1. En el 18% puntos con crecimiento, y tras su identificación, los

principales géneros observados fueron *Penicillium* (22,5%), diversas especies de *Fusarium* (10,4%), *Alternaria*, principalmente *A. alternata* (9,28%) y *Aspergillus*, mayoritariamente las especies *A. niger* y *A. flavus* (8,89%). Se trata de resultados similares a los obtenidos por Soldevilla (1995), que menciona diferentes especies del género *Penicillium* como las colonias observadas en mayor proporción en semilla de *P. pinaster*. Por otro lado, Botella y col. (2010), en aislamientos efectuados en ramillas y acículas de *P. halepensis*, identificaron al complejo *A. alternata* como el más abundante, seguido de *A. niger*.

En menor medida aparecieron los géneros: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y *Ulocladium*, con valores de entre el 1 y el 5% del total de puntos de aislamiento, así como los géneros *Diplodia*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Stemphylium* y *Trichothecium*, con valores comprendidos entre el 1% y el 0,05%. Con valores inferiores al 0,05% del total de puntos muestreados se encontraron los géneros *Botryosphaeria*, *Chaetomium*, *Cylindrocladium*, *Curvularia*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Rhizomucor*, y otros. La presencia sobre piñón de *P. pinaster* de *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus* spp., *Stemphylium botryosum* y *Trichoderma viride* en diferentes proporciones ya fue citada por Soldevilla (1995), mientras que Bueno y col. (2010) mencionaron a *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *Mucor* sp., *A. niger* y *Gliocladium viride* como los principales saprofitos aislados en dicha especie.

En ninguno de los lotes estudiados se consiguió aislar al patógeno de cuarentena *F. circinatum*, cuya dispersión en España se citó en 2005 por Landera y col. A tal efecto, se prestó especial interés por las muestras procedentes de la Cornisa Cantábrica y zona norte de España, donde se ha detectado recientemente la enfermedad del chancro resinoso causada por este hongo, según Pérez-Sierra y col. (2007). De todas las colonias pertenecientes al género *Fusarium* que se han aislado en este trabajo, se logró identificar a *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* y *F. solani*, algunas de las cuales presentan el interés de ser patógenas a otras especies vegetales. En trabajos anteriores ya se observaron algunas de estas especies de *Fusarium* en semilla de *Pinus* spp. en Galicia (González y col., 2008).

Además de constatar la ausencia de *F. circinatum*, no se observó ninguna de las principales especies patógenas de *Pinus* spp. en España. No

Código	Año	Especie	Zona de Procedencia	Localidad (Provincia)	Comunidad autónoma
A32	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra del Teleno	Luyego (León)	Castilla y León
A33	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Oña	Oña (Burgos)	Castilla y León
A34	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gredos	Cuevas del Valle (Ávila)	Castilla y León
A35	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gredos	El Arenal (Ávila)	Castilla y León
A36	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gredos	El Arenal (Ávila)	Castilla y León
A37	2008	<i>P. pinaster</i>	Meseta Castellana	Coca/Navas de Oro (Segovia)	Castilla y León
A38	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Guadarrama	Navas del Marqués (Ávila)	Castilla y León
A39	2008	<i>P. pinaster</i>	Levante	Cortes de Pallas (Valencia)	Com. Valenciana
A40	2008	<i>P. pinaster</i>	Sistema Ibérico Central	Codos (Zaragoza)	Aragón
A41	2008	<i>P. pinaster</i>	Maestrazgo	Vistabella del Maestraz (Castellón)	Com. Valenciana
A42	2008	<i>P. pinaster</i>	Maestrazgo	Rubielos de Mora (Teruel)	Aragón
A43	2008	<i>P. pinaster</i>	Albarracín	Rubiales (Teruel)	Aragón
A44	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Espadán	Serra (Valencia)	Com. Valenciana
A45	2008	<i>P. pinaster</i>	Sistema Ibérico Central	Herrera de los Navarros (Zaragoza)	Aragón
A46	2008	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gata-Las Hurdes	Pinofranqueado (Cáceres)	Extremadura
A47	2008	<i>P. pinaster</i>	Bajo Tietar	Talayuelas (Cáceres)	Extremadura
A48	2009	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Segura Alcaraz	Cazorla (Jaén)	Andalucía
A49	2009	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Almirajera - Nevada	Alhama de Granada (Granada)	Andalucía
A50	2009	<i>P. pinaster</i>	Rodanales de Molina	Corduente (Guadalajara)	Castilla Mancha
A51	2009	<i>P. halepensis</i>	Huerto samillero	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A52	2009	<i>P. halepensis</i>	Huerto Pus-Patrón	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A53	2009	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gredos	El Arenal (Ávila)	Castilla y León
A54	2009	<i>P. pinaster</i>	Meseta Castellana	Coca (Segovia)	Castilla y León
A55	2009	<i>P. pinea</i>	Meseta Norte	Tordesillas (Valladolid)	Castilla y León
A56	2009	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gata-Las Hurdes	Pinofranqueado (Cáceres)	Extremadura
A57	2009	<i>P. pinaster</i>	Bajo Tietar	Talayuelas (Cáceres)	Extremadura
A58	2009	<i>P. pinaster</i>	Rodanales de Molina	Corduente (Guadalajara)	Castilla Mancha
A59	2009	<i>P. halepensis</i>	Huerto semillero	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A60	2009	<i>P. pinea</i>	La Mancha	Tarazona de la Mancha (Albacete)	Castilla Mancha
A61	2009	<i>P. pinea</i>	Garrovillas	Garrovillas (Cáceres)	Extremadura
A62	2009	<i>P. pinea</i>	Biar	Biar (Alicante)	Com. Valenciana
A63	2009	<i>P. halepensis</i>	Huerto semillero	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A64	2009	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Oña	Oña (Burgos)	Castilla y León
A65	2010	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Segura Alcaraz	La Iruela (Jaén)	Andalucía
A66	2010	<i>P. pinaster</i>	Montaña Soria Burgos	Navaleno (Soria)	Castilla y León
A67	2010	<i>P. pinaster</i>	Montaña Soria Burgos	San Leonardo de Yagüe (Soria)	Castilla y León
A68	2010	<i>P. halepensis</i>	Huerto semillero	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A69	2010	<i>P. pinea</i>	Garrovillas	Garrovillas (Cáceres)	Extremadura
A70	2010	<i>P. pinea</i>	Depresión del Gusdalquivir	Hinojos (Huelva)	Andalucía
A71	2010	<i>P. pinea</i>	Valle del Tietar y del Albarche	Almorox (Toledo)	Castilla Mancha
A72	2010	<i>P. halepensis</i>	Cazorla	Cazorla (Jaén)	Andalucía
A73	2010	<i>P. halepensis</i>	Bética Meridional	Jaén (Jaén)	Andalucía
A74	2010	<i>P. pinaster</i>	Albarracín	Rubiales (Teruel)	Aragón
A75	2010	<i>P. pinaster</i>	Montaña Soria Burgos	Navaleno (Soria)	Castilla y León
A76	2010	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gata-Las Hurdes	Descargamaria (Cáceres)	Extremadura
A77	2010	<i>P. pinea</i>	La Mancha	Tarazona de la Mancha (Albacete)	Castilla Mancha
A78	2010	<i>P. pinaster</i>	Montaña Soria Burgos	San Leonardo de Yagüe (Soria)	Castilla y León
A79	2010	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gata-Las Hurdes	Pinofranqueado (Cáceres)	Extremadura
A80	2010	<i>P. pinaster</i>	Rodanales de Molina	Corduente (Guadalajara)	Castilla Mancha
A81	2010	<i>P. pinea</i>	Meseta Norte	Tordesillas (Valladolid)	Castilla y León
A82	2011	<i>P. pinaster</i>	Pinar de Valsain	San Ildefonso (Segovia)	Castilla y León
A83	2011	<i>P. halepensis</i>	Huerto semillero	Ataquás (Valencia)	Com. Valenciana
A84	2011	<i>P. pinaster</i>	Pinar de Valsain	San Ildefonso (Segovia)	Castilla y León
A85	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Gredos	Cenicientos (Madrid)	Com. Madrid
A86	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Almirajera - Nevada	Monachil (Granada)	Andalucía
A87	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Almirajera - Nevada	Alhama de Granada (Granada)	Andalucía
A88	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Guadarrama	San Lorenzo del Escorial (Madrid)	Com. Madrid
A89	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Segura Alcaraz	Cazorla (Jaén)	Andalucía
A90	2011	<i>P. pinaster</i>	Albarracín	Rubiales (Teruel)	Aragón
A91	2011	<i>P. pinaster</i>	Rodanales de Molina	Corduente (Guadalajara)	Castilla Mancha
A92	2011	<i>P. pinaster</i>	Sierra de Segura Alcaraz	Cazorla (Jaén)	Andalucía

**Cuadro 1. Procedencia de las 67 muestras de *Pinus halepensis*, *P. pinaster* y *P. pinea* evaluadas.**

obstante, destaca la aparición de *Diplodia* spp. en lotes procedentes de todas las Comunidades Autónomas excepto la Comunidad de Madrid, para las tres especies de *Pinus* consideradas entre los años 2008 y 2010, con un resultado global de 0,36% de los puntos aislados. En este caso, sería necesario su identificación a nivel de especie, ya que *D. pinea* ha sido citada como patógeno en *P. halepensis* y otras especies de *Pinus* en España (Iturriza y Ganley, 2007; Botella y Díez, 2011). Asimismo, otra especie del mismo género, *D. scrobiculata*, ha mostrado su aptitud para ser utilizada para el control de la propia *D. pinea* (Muñoz y col., 2008). Por otra

parte, en una de las muestras procesadas en 2008 procedentes de Castilla y León, se halló un 0,2% de *Pestalotia* spp. En 2003 se reportó la presencia de *P. stevensonii* en acículas de *P. pinea* muestreadas en diferentes puntos de Castilla y León, primera cita de este patógeno en España afectando a dicha especie de pino (Veroz y col., 2003).

Por último, *Botryosphaeria* spp. fue encontrada en tres de los cuatro años muestreados, en Castilla y León, Comunidad Valenciana y Extremadura, en los lotes de *P. pinaster* y *P. pinea*, en un 0,03% de los puntos analizados. En 2002 se comunicó la presencia del patógeno *B. dothidea* afectando

a *Cistus ladanifer* en Andalucía, una especie arbustiva asociada a las masas boscosas de pino en esa comunidad autónoma (Sánchez-Hernández y col., 2002).

En el futuro sería necesario profundizar en el estudio de todas las colonias observadas, para

lograr su identificación a nivel de especie, para poder descartar la presencia de alguno de los patógenos citados en España y otros países, así como proseguir con la evaluación de lotes de semilla certificada de otras procedencias, con el fin de obtener mayor información sobre su estado sanitario.

Este trabajo se realizó en base al convenio firmado entre la DGDPRF y el INIA en diciembre de 2006.

## BIBLIOGRAFÍA

- Botella, L., Santamaría, O., Díez, J.J. 2010. *Fungi associated with the decline of Pinus halepensis in Spain*. Fungal Diversity, 40: 1-11.
- Botella, L., Díez, J.J. 2011. *Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of Pinus halepensis*. Fungal Diversity, 47: 9-18.
- Bueno, A., Díez, J.J., Fernández, M.M. 2010. *Ophiostomatoid fungi transported by Ips sexdentatus (Coleoptera; Scolytidae) in Pinus pinaster in NW Spain*. Silva Fennica, 44(3): 387-397.
- González, B., Pintos, C., Mansilla, J.P., Aguin, O., Pérez, R. 2008. *Presencia de especies de Fusarium sobre semillas de Pinus spp. en Galicia*. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales, 26:149-154.
- Iturrutxa, E., Ganley, R. 2007. *Dispersión por vía aérea de esporas de Diplodia pinea en tres localidades de la cornisa cantábrica*. Boletín Sanidad Vegetal Plagas, 33: 383-390.
- 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, 89: 1015.
- Muñoz, Z., Moret, A., Garcés, S. (2008). *The use of Verticillium dahliae and Diplodia scrobiculata to induce resistance in Pinus halepensis against Diplodia pinea infection*. European Journal of Plant Pathology, 120: 331-337.
- 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(7): 832-839.
- Sánchez-Hernández, M.E., Gutiérrez-García, J., Trapero-Casas, A. (2002). *Botryosphaeria canker of Cistus ladanifer*. Plant pathology, 51(3): 365-373.
- Soldevilla, C. (1995). *Marras de origen fúngico (Damping off) en plantas del género Pinus spp. cultivadas en invernadero*. Boletín Sanidad Vegetal Plagas, 21:87-109.
- Veroz, D., Alves-Santos, F.M., Díez, J. (2003). *Occurrence of Pestalotia stevensonii on Pinus pinea on Spain*. New Disease Reports, 8: 21.