

INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN ESPORAL DE CEPAS PATÓGENAS DE *FUSARIUM SP.* MEDIANTE FILTRADOS “IN VITRO” DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS COMESTIBLES.

Martín, P.; Olaizola, J.; Fernández, M.; Pajares, J. A., Diez, J. J.

Universidad de Valladolid. Area de Plagas y Entomología Forestal. Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura. E. T. S. de Ingenierías Agrarias. Campus de La Yutera. Edificio E. Av./ Madrid 44. 34071. Palencia. pmpinto@pvs.uva.es.

RESUMEN

El Damping-off causa importantes daños en viveros forestales de todo el mundo. Su control debe enfocarse desde la perspectiva de un Manejo Integrado donde el empleo de la micorrización juega un papel fundamental como posible Control Biológico. Mediante la micorrización con hongos comestibles se puede obtener un doble beneficio. Por una parte, reducir los daños causados por esta importante enfermedad y por otra conferir al monte un importante valor añadido con productos altamente demandados y de un importante valor gastronómico.

En este estudio se ha analizado la influencia de varios hongos ectomicorrícicos comestibles (*Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata*, *Lactarius deliciosus* -2 cepas diferentes-, *Amanita ovoidea*, *Hygrophorus marzuolus* y *Leccinum lepidus*) sobre 4 cepas patógenas de *Fusarium sp.* (2 de *F. oxysporum* y 2 de *F. moniliforme*).

Los resultados han reflejado un importante efecto inhibitor de *L. deliciosus*, fundamentalmente sobre la germinación esporal de las dos cepas de *F. moniliforme*. Sin embargo, para las cepas *F.o.4* y *F.o.5* los filtrados que mayor efecto han producido han sido los de *B. edulis* y *R. roseolus* en la primera y *L. lepidus* en la segunda.

SUMMARY

Damping-off is one of the most dangerous diseases in forest nurseries. Its control has to be focused with Integrate Management. Mycorrhization can play an important role as Biological Control for this disease. The use of ectomycorrhizal edible fungi can permit to obtain two

different purposes. Damages can be diminished and on the other hand, economical value of forest grounds can be increased.

In this study, the influence of several ectomycorrhizal eatable fungi (*Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata*, *Lactarius deliciosus* -2 different strains-, *Amanita ovoidea*, *Hygrophorus marzuolus* y *Leccinum lepidus*) on spores germination for two different pathogenic fungal species (*F. oxysporum* and *F. moniliforme*) has been analysed.

An inhibitor effect of *L. deliciosus* against *Fusarium spp.* spore germination has been found, for three of the four analysed strains.

INTRODUCCION

La enfermedad que más daños causa en viveros forestales de todo el mundo es la denominada Damping-off (Nef et al., 1999; Pedersen et al, 1999; Sutherland et al., 1990). Trabajos previos realizados sobre plántulas de viveros forestales en Castilla y León, han concluido que los agentes patógenos más frecuentemente implicados en el desarrollo de esta enfermedad en esta región han sido *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme* (Martín et al, 2002; Mansilla com pers, 2002)

El ataque de estos patógenos ocasiona una invasión micelial de los tejidos vasculares, provocando un bloqueo de los vasos del xilema, impidiendo el transporte del agua, y provocando marchitamiento (Alexopoulos & Mims, 1985). Por otra parte, la producción de toxinas favorece este marchitamiento ya que afecta a la permeabilidad de las membranas celulares y altera el metabolismo celular (Alexopoulos & Mims, 1985). Entre los múltiples beneficios que los hongos ectomicorrícicos aportan a las plantas hospedantes, están la producción por parte del hongo de antibióticos, fitohormonas y otros compuestos que inhiben el crecimiento y avance de patógenos.

La micorrización es uno de los métodos de Control Biológico más generalizados para el manejo de esta enfermedad (Chakravarti et al., 1999; Pedersen et al., 1999; Annesi & Motta, 1998; Stenstrom et al., 1997.). Algunos de los hongos ectomicorrícicos ensayados "in vitro" para su control han sido *Boletus sp*, *Suillus sp.*, *Chromogomphus rutilus* y *Xerocomus chrysenteron* (Lei et al., 1995), *Laccaria bicolor*, *Clitocybe clavipes* y *Paxillus involutus* (Chakravarty et al., 1999).

Muchas de estas especies no son comestibles, e incluso algunas mortalmente tóxicas como *Paxillus involutus*, por lo que al utilizarlas se está perdiendo la posibilidad de fomentar un recurso del monte que, en muchas de las zonas aptas para reforestación en nuestro país, podría suponer hasta 3 veces el valor económico del aprovechamiento maderero (Oria com. pers., 2001). Sin embargo, es posible obtener inóculo en el laboratorio y micorrizar otras

muchas especies comestibles como *Boletus edulis*, *Tuber melanosporum*, *Suillus luteus*, o *Tricoloma equestre* (Fernández, com. pers., 2001) y otras como *Lactarius deliciosus*, que está siendo ya comercializada por diferentes empresas en nuestra geografía, pero de los que nada se sabe sobre su poder protector frente a patógenos.

Dado que la efectividad de esta protección depende de la especie micorrícica e incluso del aislamiento de la especie hospedante (Sampagni et al., 1985), en este trabajo hemos analizado la posible influencia de diferentes hongos ectomicorrícicos comestibles sobre la germinación esporal de las cepas patógenas con la finalidad de conocer cuales de estas especies o aislamientos micorrícicos ofrecen una mayor capacidad de protección frente a las diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme* aislados de plántulas de viveros forestales de Castilla y León.

MATERIAL Y MÉTODOS

AISLAMIENTOS FÚNGICOS

Para este ensayo, se han empleado cuatro cepas de *Fusarium sp.* (2 de *Fusarium oxysporum*: *F.o.4*, *F.o.5* y otras 2 de *F. moniliforme*: *F.m.5* y *F.m.6*). Estas cepas habían sido previamente aisladas de plántulas forestales (*Pinus sp.* y *Quercus sp.*) procedentes de cuatro viveros de Castilla y León. Varios fragmentos de raíces y tallos fueron, previa esterilización, insertados en placas Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio selectivo de cultivo K (Komada, 1975). Las colonias de *Fusarium spp.* se repicaron a placas limpias para confirmar el diagnóstico y preparar los aislamientos monospóricos que serían conservados posteriormente a -45°C . Las cepas de este estudio fueron sometidas a ensayos para confirmar su efecto fitopatógeno (datos no mostrados).

Por otra parte, los hongos ectomicorrícicos seleccionados fueron *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata*, *Lactarius deliciosus* (2 cepas diferentes, *a* y *b*), *Amanita ovoidea*, *Hygrophorus marzuolus* y *Leccinum lepidus*. Los hongos fueron cultivados en frascos Erlenmeyer estériles de 250 ml, en los que previamente se había dispersado 200ml de medio microbiológico de cultivo líquido MMN. Las cepas estuvieron creciendo durante ... días en condiciones controladas de luz y temperatura.

CONFRONTACIÓN ENTRE SOLUCIONES ESPORALES Y EXTRACTOS DE CULTIVO

Para la preparación de los extractos procedentes de los hongos micorrícicos, el contenido de los Erlenmeyer fue sometido a un doble filtrado en condiciones de esterilidad (papel filtro

Watmann nº1 y filtro milipore 0.22 micras). El extracto resultante fue conservado en tubos Eppendorf estériles de 2 ml, en oscuridad a 4°C hasta la realización de la confrontación.

En las placas con las cepas patógenas se añadieron 3 ml de agua destilada estéril para elaborar una solución esporal madre. Mediante el empleo de Cámara Thoma se determinó la concentración esporal inicial, que se diluyó en agua destilada estéril hasta alcanzar las concentraciones esporales finales de $3 \cdot 10^6$ esporas/ml, que posteriormente se utilizaron en la confrontación.

Finalmente, 100 ml de filtrado de cultivo de cada hongo ectomicorrícico fueron confrontados con 100 ml de suspensión esporal de cada cepa patógena. Para el control se mezclaron los 100 ml de suspensión esporal con 100 ml de MMN líquido sometido a las mismas condiciones que los extractos de los hongos ectomicorrícicos. La influencia de los filtrados se analizó a las 0, 6, 12 y 24 horas. Todos los recuentos de la germinación esporal se realizaron bajo microscopio mediante el empleo de Cámara Thoma para facilitar la labor.

ANÁLISIS DE DATOS

El desarrollo del experimento dio lugar a 16 confrontaciones (2 por cada hongo ectomicorrícico empleado) a las que hay que añadir 4 controles (uno por cada cepa patógena). Con fines estadísticos, para cada uno de estos 20 cruces resultantes, se ejecutaron 6 réplicas, en cada una de las cuales se contaron 200 esporas para la obtención de los porcentajes de germinación.

Los datos fueron analizados mediante Test ANOVA con grado de significación ($P < 0.05$), con ayuda del paquete estadístico SPSS+ (SPSS Inc., Illinois, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis realizado a las 0 horas, tenía como objetivo comprobar que en las soluciones esporales de las cepas patógenas no existía germinación desde el momento de su preparación hasta la confrontación, pudiendo así homogeneizar los resultados. Como era de esperar no se observó germinación en este análisis en ninguna de las confrontaciones

A partir de las 6 horas, comenzaron a observarse las primeras señales de inhibición en la germinación esporal en 3 de las 4 cepas patógenas analizadas por parte de algunos de los hongos ectomicorrícicos. La cepa *F.o.4* no sufrió hasta ese momento inhibición alguna. Sin embargo, fue precisamente esta cepa la que en el análisis final (a las 24 horas), sufrió una mayor restricción en la germinación esporal (ANOVA, $P < 0.05$). Esto se logró mediante el

empleo de *L. deliciosus* (a y b) y *R. roseolus*, *Leccinum lepidus* y *Amanita ovoidea* que provocaron una inhibición superior al 50%, claramente superior a la producida por el resto de hongos ectomicorrícicos analizados.

En el análisis llevado a cabo a las 12 horas, se observó una disminución de la germinación esporal para las 4 cepas patógenas, en las confrontaciones con todos los filtrados. En todas ellas, la mayor inhibición sobre la germinación esporal fue lograda por *L. deliciosus* (cepa a) (ANOVA, $P < 0.05$).

Transcurridas 24 horas, el efecto inhibitor logrado por *L. deliciosus* seguía siendo superior al resto de los hongos ectomicorrícicos para las 2 cepas de *F. moniliforme* estudiadas. Por otro lado, en la cepa *F.o.4*, las mayores inhibiciones fueron logradas mediante *B. edulis* y *R. roseolus*. Mientras que en la cepa *F.o.5* este efecto fue conseguido con el filtrado procedente de *L. lepidus*.

Como conclusión podemos resumir que *L. deliciosus* (a) fue el aislamiento con el que se lograron los mejores efectos en la inhibición de la germinación para las 2 cepas de *F. moniliforme*, no ocurriendo así ni en *F.o.4* ni en *F.o.5* donde las mayores inhibiciones se consiguieron con *B. edulis* y *R. roseolus* en la primera y *L. lepidus* en la segunda.

Este estudio será completado con otros en los que se trabaje directamente con planta tanto "in vitro" como "en contenedor" donde se comprobarán los efectos de protección "in vivo". Sin embargo, parece apuntarse que la micorrización de plántulas forestales con *L. deliciosus* puede resultar muy interesante desde un doble punto de vista. Por una parte puede prevenir enfermedades en los viveros forestales y en las consiguientes repoblaciones, y por otra confiere al monte un importante valor añadido. En cuanto al primero de los objetivos, los integrantes del sector productor de planta para reforestar, viveristas particulares y responsables de las administraciones autonómicas y otros organismos oficiales, vienen expresando la gran necesidad de apoyo científico en la detección y control de los problemas fitosanitarios a los que se enfrentan, que facilite la obtención de planta sana y vigorosa que pueda ser utilizada con garantías en la reforestación. Por lo tanto, la transferencia de resultados de un estudio como el que aquí se propone, sería muy rápida y abriría el camino para la solución de los problemas fitosanitarios específicos causados por estos hongos. En cuanto al segundo, el resultado sería muy positivo dado que esta especie es comestible y de indudable interés gastronómico y por tanto demandada por un amplio sector de la sociedad que valora, y cada vez más, este tipo de productos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. 1985. Introducción a la micología. Omega, S.A. Barcelona.
2. Annesi, T.; Motta, E. (1998) Hebeloma inoculation on Norway spruce seedlings in solarized and infested soil. Eur. J. For. Path Vol 28, N°3 pp 159-166
3. Chakravarty, P. Khasa, D. Dancik, B. Sigler, L. Wichlacz, M. Trifonov, L.S. Ayer, W.A.(1999) Integrated control of Fusarium damping-off in conifer seedlings Pfl Krankh 4/99 pp342-352
4. Fernández, M. (2001). Comunicación personal. Centro de Investigaciones Forestales de Valonsadero. Soria. España.
5. Lei ZengPu; Jin JunRan; Wang ChanWeng. 1995. Antagonism between ectomycorrhizal fungi and plant pathogens in Mycorrhizas for plantation forestry in Asia: Proceedings of an international symposium and workshop, Kaiping, Guangdong province, P. R. China. Pp 77-81.
6. Mansilla, J.P. (2002). Comunicación personal. Estación Fitopatológica Do Areeiro. Pontevedra. España.
7. Martín, P.; Osorno, O.; Pajares, J; Diez, J.. 2001. Estudio de las Enfermedades Fúngicas en los Viveros Forestales de Castilla y León. III Congreso Forestal Español. Septiembre 2001 Granada.
8. Nef, L.& Perrin, R.:(1999a) Damaging Agentes in European Forest Nurseries. Practical handbook. Luxemburg. pp 17-19
9. Oria, J.A. (2001). Comunicación personal. ETSIIAgrarias. Universidad de Valladolid. Palencia. España.
10. Pedersen, E.A.; Reddy, M. S.; Chakravarty, P. (1999) Effect of three species of bacteria on Damping-off, root rot development, and ectomycorrhizal colnization of lodgepole pine and white spruce seedlings. Eur. J. For. Path. 29 pp 123-134.
11. Sampagni, R.; Perrin, R.; Tacon, F. (1985) "Disease supressio of growth of Norway spruce and Douglas fir seedlingsby the ectomycorrhizal fungus Laccaria laccata in forest nurseries. In: Gianinazii-Pearson, V; Gianinazii, S. (Eds)First European Simposium on Mycorrhizae p 799-806. Dijon. France
12. Stenstrom, E.; Damm, E.; Unestam, T. (1997). The role of mycorrhizas in protecting forest trees from soil pathogenic fungi. Revue Forestiere Francaise N. sp. pp 121-128
13. Sutherland, J. R. (1990). Cone and seed diseases of conifers in Canada In: Cone and Seed Pest Workshop. De. By West, R. J. Inf. Report N-X-274. St. Johns, Newfoundland, Canada: Forestry Canada, pp. 25-36.