

DETECCIÓN DE MICROMICETOS EN SEMILLAS DE *Pinus montezumae* LAMB.

MICROFUNGI DETECTION IN PINE SEEDS OF *Pinus montezumae* LAMB.

Fidel Jonathan Salgado-Lucena¹, Edgar Martínez-Fernández^{2*},
Patricia Martínez-Jaimes², Carlos Manuel Acosta-Durán³.

¹Facultad de Ciencias Biológicas; ²Centro de Investigaciones Biológicas; ³Facultad de Ciencias Agropecuarias; Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

*Autor para correspondencia: Correo-e: edgar@uaem.mx

RESUMEN

Se analizaron las semillas de *Pinus montezumae* Lamb. de un vivero forestal de Cuernavaca, Morelos. Mediante la técnica de cámara húmeda se indujo la esporulación de mohos sobre la superficie de las semillas de pino, los cuales se transfirieron a medio de cultivo PDA acidificado para su desarrollo. De estas colonias se obtuvieron cultivos monospóricos mediante la técnica de puntas de hifas. A partir de los cultivos puros se hicieron preparaciones temporales para la observación de las estructuras vegetativas y cuerpos fructíferos de los micromicetos. Considerando los aspectos macroscópicos de los hongos creciendo en el medio de cultivo y sus características microscópicas se identificaron a los hongos *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* sp. Estos hongos

han sido reportados como un factor limitante en el proceso de germinación de las semillas de pino y en el desarrollo óptimo de sus plántulas.

Palabras clave: Semillas, *Pinus montezumae*, germinación, *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

Pinus montezumae seeds of a forest nursery in Cuernavaca, Morelos, México, were analyzed. Through the technique of moist chamber mold sporulation was induced on the surface of the pine seeds, which were transferred to culture medium PDA acidified for development. Monospore cultures of these colonies were obtained through the

technique of hyphal tips. From pure cultures preparations were made for observing vegetative structures and fruiting bodies of microfungi. Considering the macroscopic aspects of microfungi growing in the culture medium and their microscopic characteristics were identified *Penicillium* and *Fusarium oxysporum*. These microfungi have been reported as a limiting factor in the process of seed germination of pine seeds and the optimal development of their seedlings.

Key words: *Seeds, Pinus montezumae, germination, Penicillium sp., Fusarium oxysporum.*

INTRODUCCIÓN

La actividad forestal en México ha mostrado cambios en los últimos años, entre otras cosas, por el mayor énfasis hacia la restauración de los ecosistemas forestales con un auge significativo en actividades de reforestación para fines diversos. La baja calidad de la planta producida en los viveros forestales, es uno de los factores del poco éxito en las plantaciones de restauración (Orozco-Gutiérrez *et al.*, 2010); entre los factores notables que inciden en la calidad de las plantas es la incidencia de plagas y enfermedades (Morales-García, 1991).

Un aspecto que debe considerarse para garantizar el éxito de los procesos de reforestación es la calidad de las semillas. Los problemas fitosanitarios que se presentan en las semillas de especies forestales pueden generar problemas económicamente importantes, ya que afectan su comercialización, pueden destruir parcial o totalmente lotes, infectar sustratos de germinación y diseminarlas de una región a otra (Arguedas y Torres, 1994; Arguedas, 1997). Los patógenos de semillas pueden localizarse tanto en el interior de la semilla como en su superficie. Muchos patógenos de semillas se activan tras la siembra, lo que puede dar lugar a la podredumbre de la propia semilla o bien pueden causar el conjunto de enfermedades específicas dando lugar a la muerte de la plántula.

Las semillas de especies forestales pueden ser infectadas por microorganismos causantes de enfermedades cuando aún se encuentran en el árbol, cuando entran en contacto con el suelo, o bien durante su transporte y almacenamiento. Al igual que en el caso de las plantas forestales adultas, la mayoría de las enfermedades que afectan a sus semillas son micosis, esto es, enfermedades causadas por hongos. A su vez, los hongos constituyen el principal grupo de organismos fitopatógenos que pueden transmitirse a través de las semillas (Sánchez *et al.*, 2003).

El *Pinus montezumae* Lamb. se ha utilizado con éxito en varios programas de reforestación, para la protección de cuencas hidrográficas y restauración de suelos degradados como en los estados de Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Hidalgo, Puebla, Jalisco y Nuevo León. Es una especie maderable de gran importancia económica. Se utiliza en la construcción, para la obtención de chapa, celulosa y resina (Zamora-Campos *et al.*, 2007).

Una de las actividades básicas en los programas de reforestación es la producción de plantas sanas en los viveros. Sin embargo uno de los problemas frecuentes que se presentan en la etapa de germinación de las semillas es el del ahogamiento o damping off, que puede ser ocasionado por varios géneros de hongos (Vázquez-Collazo y Sánchez-Ramírez, 1981) y que deben ser identificados para establecer las medidas de manejo más apropiadas a esta problemática. Por tanto el presente trabajo tiene como objetivo general el de aislar e identificar los micromicetos que representan un factor limitante en la germinación de las semillas de *Pinus montezumae* Lamb.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEM. Las semillas de *Pinus montezumae* analizadas

se obtuvieron de un vivero forestal ubicado en el norte Cuernavaca, Morelos.

El aislamiento de los hongos de las semillas se realizó mediante el método de inducción de la esporulación basado en la utilización de cámaras húmedas (Tuite, 1969), en dos bioensayos. En el primer bioensayo, se utilizaron 200 semillas, 100 de estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 %, durante 5 minutos y otras 100 durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron de tres ocasiones con agua estéril y se secaron en papel estéril durante 10 minutos. En el segundo bioensayo se utilizaron 400 semillas, de las cuales 200 se lavaron con agua y jabón y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (3%) durante 3 minutos, se secaron con papel estéril durante 10 minutos; por otra parte 200 semillas, solo se lavaron con agua y jabón y se secaron en papel estéril durante 10 minutos.

Las cámaras húmedas se elaboraron con cajas Petri de 14 cm de diámetro en cuyo fondo se colocaba papel filtro esterilizado humedecido con agua destilada estéril. Sobre el papel se colocaban dos rejillas de plástico desinfectadas con alcohol al 96%. Sobre caja rejilla se colocaron 10 semillas tratadas como se indicó anteriormente, se sellaron con parafilm, y se mantuvieron en observación durante siete días para detectar el desarrollo de micromicetos.

Después del periodo de incubación las semillas fueron revisadas a simple vista para observar estructuras fructíferas o vegetativas de micromicetos en la superficie de las semillas, posteriormente con una aguja de disección previamente flameada se tomaron hifas y/o esporas y se depositaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar adicionado con ácido láctico y se incubaron durante 10 días a 26 °C. De las colonias obtenidas se obtuvieron cultivos monospóricos mediante la técnica de rayado en placa y transferencia de puntas de hifas. En este procedimiento se tomaron esporas de las colonias desarrolladas y se

depositaron en línea en medio de cultivo agua agar, a las 24 horas se observaron en el microscopio estereoscópico Nikon 800 las esporas que habían germinado, seleccionando las hifas individuales y transfiriéndolas a medio de cultivo papa dextrosa agar.

Para la identificación de los cultivos monospóricos se elaboraron preparaciones temporales para la observación de las estructuras fructíferas de los micromicetos tales como conidióforos, fiálides, clamidosporas, conidios y de acuerdo a las dimensiones y características de esas estructuras se determinó el género basándose en monografías y obras taxonómicas del área de micología. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio Nikon Ni U y se obtuvieron imágenes con una cámara Lumenera Infinity.

A partir de las colonias identificadas como *Fusarium* se tomaron secciones de hifas que se transfirieron con agujas de disección estéril a cajas Petri que contenían los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), hojas de clavel agar (HCA) y Spezieller Nährstoffmarmmer agar (SNA), de acuerdo a la metodología de Leslie y Summerell (2006), las cuales se incubaron a 23-26 °C en condiciones de luz continua durante 7-8 días. La identificación de las especies de *Fusarium* se basó en las claves de Booth (1971), Gerlach y Nirenberg (1984) y Leslie y Summerell (2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de la cámara húmeda se favoreció el desarrollo de los micromicetos presentes en las semillas de *Pinus montezumae* Lamb (Figura 1).

Se observó una variación en la presencia de micromicetos en los dos bioensayos realizados. En el primer bioensayo, usando hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos se observó un 79% de semillas con micromicetos y 71% cuando se

desinfectó durante 10 minutos. En el segundo tratamiento, se observó un 41% de semillas con micromicetos, usando hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos, por otra parte, cuando no se utilizó hipoclorito de sodio al 3% se obtuvo un 89% de semillas con micromicetos. En reportes previos se han obtenido porcentajes bajos de semillas de pino con micromicetos (Mittal y Wang, 1987), pero en semillas de coníferas con largos periodos de almacenamiento se ha encontrado porcentajes altos de infección con micromicetos (Axelrood et al., 1995).



Figura 1. Se observa una semilla de pino con desarrollo de micromicetos

Los micromicetos aislados de las semillas de pino corresponden en su mayoría a los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. Estos dos géneros de micromicetos se incluyen dentro de la clase de los Deuteromycetes y se distinguen por el tipo de conidióforo y las características de sus conidios (Barnett y Hunter, 1998).

Las colonias de *Penicillium* desarrolladas en medio de cultivo PDA presentaron un micelio flocoso de tonalidades verdes. Las estructuras típicas de estos micromicetos son sus conidióforos ramificados. En el ápice de cada rama se forman grupos de fiálides que dan origen a esporas redondas en cadenas (Figura 2).

Los aislamientos de *Fusarium* en los diferentes medios de cultivo presentaron características macroscópicas típicas del

género: el micelio desarrollándose en PDA presentó una intensa pigmentación violácea, mientras en SNA y HCA presentaron un micelio algodonoso sin coloración.

En cuanto a las características microscópicas, los aislamientos de *Fusarium* analizados presentaron macroconidios rectos a ligeramente curvos, relativamente delgados, de 30.1 – 38.6 de largo y de 2.9 a 3.2 de ancho (Figura 3), microconidios abundantes y las clamidosporas intercalares o terminales, de pared rugosa (Figura 4) y con base a estas características se determinó que corresponde a la especie *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen. Las características macroscópicas y microscópicas observadas concuerdan con las descripciones de Booth (1971), Gerlach y Nirenberg (1984) y Leslie y Summerell (2006).



Figura 2. Conidióforos y esporas de *Penicillium* sp.

Penicillium y *Fusarium* son géneros de hongos patógenos que se caracterizan por degradar la semilla, estableciéndose en la parte interna de la semilla. Algunas especies de *Penicillium* se comportan como saprobios o se encuentran asociados a otros hongos donde las semillas no germinan y se reportan como causante de marchitamiento en plántulas recién emergidas y como patógeno de semillas en varias especies forestales (Arguedas, 1997; Neergaard, 1988; Yue-Luan, 1993).



Figura 3. Macroconidios de *Fusarium oxysporum*.

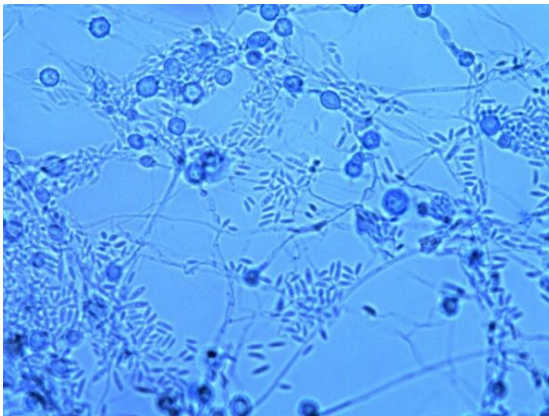


Figura 4. Microconidios y clamidosporas de *Fusarium oxysporum*.

Ciertas especies de *Fusarium* son conocidas como patógenos de viveros forestales, entre las enfermedades que se asocian a este grupo de hongos son ahogamientos, pudrición de raíces, canchales y necrosis de semillas. Las distintas especies de *Fusarium* difieren en la especificidad por el huésped y en la patogenicidad teniendo predilección por las coníferas y en particular los pinos (Viljoen *et al.*, 1992; Viljoen *et al.*, 1994).

Fusarium oxysporum es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland,

1988). *F. oxysporum* se ha aislado de semillas de *Pinus gerardiana* en Pakistán (Bilgrami y Ghaffar, 1993), de *Pinus strobus* L. de Canadá (Mittal y Wang, 1987), de *Pinus nigra* en España (Martín-Pinto *et al.*, 2008).

El establecimiento de las especies de *Fusarium* en las semillas de los pinos posiblemente sucede después de la formación de las semillas o durante la apertura de los conos (Mittal y Wang, 1987) o durante la extracción, transporte, almacenamiento o siembra.

Las especies de *Penicillium* y *Fusarium* pueden ser introducidas en los viveros mediante distintas vías ya sea a través de semillas contaminadas, dispersión de esporas por el viento, la lluvia y los insectos y por la utilización de suelo contaminado. El control sanitario en los viveros es fundamental para minimizar estos problemas existiendo distintas estrategias para ello. Una de las prácticas más frecuentes es la utilización de productos químicos (fungicidas), dado a su aplicación ha generado problemas ambientales se han desarrollado otras estrategias más amigables para el ambiente como es el control biológico (Viljoen *et al.*, 1992).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados, los hongos asociados a las semillas de *Pinus montezumae* Lamb. se identificaron como *Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum*. Estos micromicetos son cosmopolitas y representan un factor limitante en el proceso de germinación de las semillas en las condiciones propias de los viveros forestales.

Es importante la detección temprana de los patógenos de las semillas de pino y mantener un control sanitario en los viveros forestales, ya que podrían ser la causa de una pobre germinación, contaminación de sustratos y diseminación de enfermedades en el vivero.

LITERATURA CITADA

- Arguedas, M. y G. Torres. 1994. Problemas fitosanitarios en semillas forestales. ITCR-CIT. Cartago. 8 pp.
- Arguedas M. 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. 120 pp.
- Axelrood, P. A., M. Neuman, D. Trotter, R. Radley, G. Shrimpton and J. Denis. 1995. Seedborne *Fusarium* on Douglas-fir: Pathogenicity and seed stratification method to decrease *Fusarium* contamination. *New Forests* 9: 35-51.
- Barnett H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th edition. The American Phytopathological Society. St Paul. 218 pp.
- Bilgrami Z. and A. Ghaffar. 1993. Detection of seed-borne mycoflora in *Pinus gerardiana*. *Pak. J. Bot.* 25 (2): 225-231.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.
- Bosland, P. W. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology*. 6: 281- 289.
- Gerlach W. and H. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Institut für Mikrobiologie. Berlin. 406 pp.
- Leslie, J. and B. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa. USA. 385 pp.
- Martín-Pinto, P., J. Pajares and J. Díez. 2008. Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* in seedlings in northwest Spain. *For. Path.* 38: 78-82.
- Mittal, R. K. and B. S. P. Wang. 1987. Fungi associated with seeds of eastern white spruce during cone processing and seed extraction. *Can. J. For. Res.* 17: 1026-1034.
- Morales-García, J. L. 1991. Enfermedades presentes en el pino durante la etapa de vivero, en el campo experimental forestal Barranca de Cupatitzio, Michoacán. *Rev. Ciencia Forestal en México* 16: 69-85.
- Neergaard, P. 1988. Seed Pathology. Copenhagen. Denmark. Macmillan. 1025 pp.
- Orozco-Gutiérrez, G., H. J. Muñoz-Flores, A. Rueda-Sánchez, J. A. Sígala-Rodríguez, J. A. Prieto-Ruiz y J. J. García-Magaña. 2010. Diagnóstico de la calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. *Rev. Mex. Cien. For.* 1(2): 134-145
- Sanchez, L. A., S. M. Arroyo y C. R. M. Navarro. 2003. Material Vegetal de reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento. Córdoba, España. 229 pp.
- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 239 pp.
- Vázquez Collazo, I. y R. Sánchez Ramírez, 1981. Identificación y control químico de Damping-off en el vivero forestal "Lázaro Cárdenas". *Ciencia Forestal* 6(30): 3-22.
- Viljoen, A., M. J. Wingfield y P. W. Crou. 1992. Fungal pathogens in *Pinus* and *Eucalyptus* seedling nurseries in South Africa: A review, *South Africa Forestry Journal* 161: 45-50.
- Viljoen A., M. J. Wingfield and W. F. O. Marasas. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.
- Yue-Luan, H. 1993. Seed testing for selected tropical trees in the ASEAN region. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre Project. Review Paper N° 2. Thailand. 82 pp.
- Zamora-Campos, E., O. G. Vázquez-Cuecuecha, A. Pérez-Ahuatzi, R. Cano-Flores, A. Aparicio-Rentería y E. Fernández-Pedraza. 2007. Variación natural de la densidad de la madera en *Pinus montezumae* Lamb. en tres altitudes del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, México. *Foresta Veracruzana* 9(2): 33-37.