



2022  
Lleida

27 · 1  
junio · juny  
juliol · juliol

Cataluña  
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a  
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

**Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022**

**ISBN 978-84-941695-6-4**

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

## Micoflora asociada a las semillas de *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* y sus posibles implicaciones en la regeneración de la especie en Cuenca

MONREAL MONTOYA, J.A.<sup>1</sup>, LUCAS BORJA, M.E.<sup>2</sup> y MUÑOZ GÓMEZ, R.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria. Universidad de Castilla-La Mancha.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética. Universidad de Castilla-La Mancha.

<sup>3</sup> Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitopatológica. Instituto agronómico Provincial de Albacete.

### Resumen

Las dificultades del pino laricio (*Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii*) para regenerarse se presentan en toda su área de distribución mundial y están relacionadas principalmente con agentes tanto bióticos (predación de las semillas o agentes fúngicos que impiden la emergencia de las semillas) como abióticos (inadecuados tratamientos selvícolas o compactación del suelo). En este trabajo se estudia la micoflora asociada a las semillas del pino laricio y su posible implicación en la regeneración de la especie en la serranía de Cuenca. En una primera fase se estudió la micoflora interna y externa de semillas recolectadas en campo, encontrándose un total de 9 géneros, con 29 colonias observadas y un Índice de contaminación de 0,6. En una segunda fase se realizó un ensayo de patogenicidad, añadiendo al sustrato sembrado con las semillas de pino un riego con inóculo fúngico, obteniéndose menos de un 15% de mortalidad superior al testigo sin inóculo fúngico. Por último, para comprobar que la desinfección de las semillas podría mejorar los porcentajes de germinación y supervivencia del pino laricio, se realizó un ensayo de germinación con aplicación de un fungicida, resultando un 84% de germinación frente al 64% del testigo sin tratar.

### Palabras clave

Pino laricio, hongos de la semilla, germinación.

### 1. Introducción

Los bosques de *Pinus nigra* Arn. han sido aprovechados para la producción de madera en distintos periodos históricos, estando además implicados en numerosos procesos interactivos con el hombre (ALEJANO et al., 1997), añadiendo de esta manera al ya de por sí importante valor forestal de la especie, un gran valor cultural. La importancia ecológica de las masas de esta especie no es menor, contando con altos valores de diversidad biológica. Sin embargo, pese a su gran relevancia ecológica y económica, *Pinus nigra* es todavía una de las coníferas europeas menos estudiadas (CLIMENT et al., 2013).

Según lo expuesto, se hace más que patente la necesidad e importancia de estudios que aborden los actuales problemas de regeneración que presenta la especie en toda su área de distribución mundial (DEL CERRO et al., 2006; DEL CERRO y LUCAS, 2007), habiéndose considerado en este sentido la regeneración natural del *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* como difícil (SERRADA et al., 1994; TÍSCAR, 2005).

En este contexto, el conocimiento de la capacidad de germinación, supervivencia y crecimiento durante la fase de plántula, así como la influencia sobre éstos de los distintos factores ambientales, se hace esencial para la completa comprensión del proceso de regeneración de la especie (LUCAS et al., 2013). Siendo en este sentido diversos los estudios que ponen de manifiesto la influencia del material genético (LUCAS et al., 2011), así como de la temperatura de incubación sobre la germinación (HERRANZ et al., 2002).

Por otra parte, estudios como el realizado por TÍSCAR (2007) en *Pinus nigra* subsp. *salzmannii*, ponen de manifiesto la importancia de la viabilidad de los piñones como uno de los factores influyentes en el proceso de regeneración de la especie, siendo necesario mencionar además que la mayoría de las enfermedades que afectan a las semillas, y por tanto a su viabilidad, son micosis (MUÑOZ et al., 1997; SÁNCHEZ y TRAPERO, 2003).

En relación a esto, SÁNCHEZ y TRAPERO (2003) afirman: “El impacto de los hongos que infectan a las semillas puede traducirse en diversos tipos de enfermedades”, las cuales, según estos mismos autores, pueden producir el aborto de la semilla, podredumbre, reducción o eliminación de la capacidad germinativa, etc. Todo lo cual se traduce en una afección negativa en lo que al proceso de regeneración natural se refiere.

Es necesario por tanto realizar estudios que aborden las patologías de origen fúngico asociadas a las semillas forestales, y en este caso en concreto, aquellas relacionadas con *Pinus nigra* subsp. *salzmannii*. No obstante, como bien expone MUÑOZ et al. (1997): “si bien la patología de las semillas de especies herbáceas es bastante conocida, la información sobre la micoflora de las semillas forestales es más fragmentaria y no siempre desligada de los estudios sobre el damping-off de plántulas postemergentes”.

En este sentido, el conocimiento y estudio de los síntomas, agentes causales, mecanismos de patogénesis y la epidemiología de las enfermedades, permitirá el diseño adecuado de métodos para combatirlas (SÁNCHEZ y TRAPERO, 2003), facilitándose y haciéndose posible así la producción en vivero de planta en un buen estado fitosanitario, imprescindible para la regeneración de los bosques existentes y para la creación de nuevas superficies (MUÑOZ et al., 1997).

## 2. Objetivos

Con este trabajo se han pretendido los siguientes objetivos: i) identificar la micoflora presente en la semilla de *Pinus nigra*, ii) detectar la posible patogenicidad de estos hongos sobre la germinación, y iii) comprobar la eficacia de la desinfección de las semillas en la germinación y supervivencia del pino.

## 3. Metodología

La semilla empleada en el presente estudio proviene de masas de *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* del monte de Utilidad Pública nº107 “El Cardozo y los Llecós” en el término municipal de Cuenca. Se recogieron aleatoriamente 10 piñas de cada uno de los 10 árboles seleccionados. La recolección fue manual, directamente del árbol con escalera y pértiga con sierra, y se realizó en enero de 2017. En total se recogieron 100 piñas de *P.nigra*.

En el laboratorio se procedió a la extracción de los piñones. Para ello se secaron las piñas en una estufa a 35-40 °C durante 24 h. Una vez realizado este paso las piñas se abrieron con facilidad, se extrajeron los piñones y se separó el ala del piñón. De esta manera se dispuso de las semillas para su posterior manipulación.

Con el objetivo de conocer los agentes fúngicos presentes en la semilla se realizaron siembras y aislamientos en medio de cultivo y en cámara húmeda. La siembra se realizó en PDA, medio no selectivo y adecuado para la mayoría de los hongos. Para este estudio se usaron cuatro lotes de 12 semillas cada uno. Un lote sin desinfectar las semillas y lavado con agua destilada, un segundo lote sumergiendo las semillas durante 10 minutos en hipoclorito sódico al 20% y aclarado después con agua estéril, un tercer lote con embriones pelados y partidos y un cuarto lote sin tratar en cámara

húmeda. Cada lote se repartió en cuatro placas, con tres semillas cada una, haciendo un total de 16 placas y 48 semillas. Tras observaciones continuas de las placas se repicaron las diferentes colonias obtenidas en PDA hasta obtener cultivos puros o se identificaron directamente en el caso de la cámara húmeda.

La identificación se ha realizado por microscopía óptica, observando las diferentes estructuras del hongo, y con la ayuda de los distintos esquemas e imágenes presentes en la bibliografía consultada (BARNETT & HUNTER, 1972; MUÑOZ et al., 1996; MONTAÑOLA, 1998) se procedía a la identificación propiamente dicha. En algunos casos y debido a la complejidad que entraña la identificación de determinadas especies fúngicas, únicamente se pudo identificar hasta nivel de género.

En el ensayo de patogenicidad se utilizaron 6 bandejas de 20 alveolos desinfectadas con hipoclorito sódico al 10% y sustrato del propio monte con una composición de 90% arena, 6% limo y 4% de arcilla, con una textura arenosa. Dicho sustrato fue desinfectado en autoclave, donde se introdujo en bolsas, a una temperatura 121 °C durante 20 minutos. Para el ensayo se seleccionó el género *Fusarium*, hongo con un alto poder de patogenicidad y presente tanto en la flora interna como externa de las semillas. Cuando los alveolos ya habían sido rellenados con el sustrato procedimos a realizar la siembra, utilizando tres bandejas con un total de 60 semillas a inocular con *Fusarium*, y tres bandejas con 60 alveolos para el testigo sin inocular. Las semillas se sembraron a una profundidad de 1 cm aproximadamente.

Por último, para comprobar la eficacia de la desinfección de semillas en la germinación y viabilidad de las plántulas, se utilizaron, usando una metodología similar a las expuesta anteriormente, 4 bandejas de 20 alveolos para semillas desinfectadas y 4 bandejas para el testigo sin tratar, en total 160 semillas. Para la desinfección se utilizó el fungicida Captan 50% a una dosis de 3g/l, realizando la inmersión de 80 semillas en el fungicida y 80 en agua destilada. Posteriormente y tras su secado en papel filtro se procedió a la siembra.

#### 4. Resultados y discusión

En el estudio de la micoflora de la semilla, se han identificado hasta nueve hongos a nivel de género y cuatro de ellos a nivel de especie. Partiendo del número de semillas (48) se han obtenido 29 colonias, los que nos da un Índice de Contaminación de 0,6. Las especies identificadas han sido *Acremonium* spp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Trichotecium roseum*. Los hongos con mayor número de colonias son *Chaetomium* spp. y *Trichotecium roseum*, seguidos de *Penicillium* spp. y *Alternaria alternata* (Tabla 1).

En el análisis realizado sobre la micoflora externa se han identificado un total de ocho hongos, que son: *Acremonium* spp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp. y *Trichotecium roseum*. La mayoría de ellos tienen un comportamiento saprofítico, pero los géneros *Alternaria*, *Epicoccum* y *Fusarium*, se pueden comportar como parásitos, produciendo necrosis en radícula y cuello.

En la micoflora interna (embrión) se han identificado un total de tres hongos: *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., y *Penicillium* spp., de estos, y como se ha indicado anteriormente, *Alternaria* y *Fusarium* son los más importantes y pueden provocar la destrucción del embrión. Estos resultados concuerdan con los observados por MUÑOZ (1997).

Por la presencia y el carácter de los diferentes hongos observados, se puede hablar de un cierto porcentaje de saprófitos, sin embargo, con un exceso de propágulos podrían generar trastornos

fisiológicos como consecuencia de la competencia por el oxígeno y nutrientes en momentos muy delicados para la semilla pudiendo llegar en determinados momentos a causar la destrucción del embrión (MUÑOZ, 1993).

Es interesante destacar también la presencia de hongos como *Epicoccum* y *Aureobasidium*, conocidos por su comportamiento endófito, y que pueden competir con hongos patógenos protegiendo a la semilla.

Tabla 1. Especies encontradas en la micoflora total de las semillas de *Pinus nigra*, número de colonias e Índice de Contaminación.

ESPECIE FÚNGICA	NÚMERO DE COLONIAS	% TOTAL
<i>Acremonium spp.</i>	1	3,44
<i>Alternaria alternata</i>	2	6,89
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	3,44
<i>Chaetomium spp.</i>	9	31,03
<i>Cladosporium spp.</i>	1	3,44
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	3,44
<i>Fusarium spp.</i>	1	3,44
<i>Penicillium spp.</i>	5	17,24
<i>Trichotecium roseum</i>	8	27,58

Número total de colonias (C) = 29

Número total de semillas (S) = 48

IC = C/S = 0,6

En el ensayo de patogenicidad con semillas inoculadas con *Fusarium spp.*, hongo cosmopolita con un amplio rango de hospedadores que puede llegar a causar síntomas mortales en pocos días, se observa que aunque existe una mayor mortalidad en estas semillas con respecto a las no inoculadas (testigo), esta diferencia parece poco relevante (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de plántulas de *P. nigra* vivas, muertas y no germinadas respecto al total y por lotes, en la cuantificación de daños por *Fusarium spp.*, así como en los testigos.

LOTE	VIVAS	MUERTAS	NO GERMINADAS
FUS1	93.33	6.67	0.00
FUS2	80.00	13.33	6.67
FUS3	93.33	6.67	0.00
TOTAL	88.89*	8.89*	2.22*
T1	66.67	26.67	6.67
T2	93.33	0.00	6.67
T3	93.33	6.67	0.00
TOTAL	84.44*	11.11*	4.44*

\*Porcentaje respecto al número total de muestras que componen el lote.

En cuanto al ensayo de germinación y viabilidad de las semillas se ha observado un total de semillas germinadas desinfectadas con fungicida de 67 frente a 51 en el testigo, lo que representa un 83,75% y 63,75% respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Germinación de las semillas de *Pinus nigra* desinfectadas con un fungicida y del testigo sin tratar. (Cada bandeja 20 semillas, total 160 semillas 80+80).

% DE GERMINACIÓN		
BANDEJA	Desinfectadas	Testigo
1	85%	65%
2	80%	60%
3	80%	70%
4	90%	60%
TOTAL	83,75%	63,75

## 5. Conclusiones

Las muestras de semillas analizadas de la especie *Pinus nigra* Arn. presentan una variedad fúngica que confirma la existencia de hongos en estas antes de su recolección. Los resultados obtenidos indican la existencia de hasta 9 géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichotecium*.

En el análisis realizado sobre la micoflora externa destacan con un mayor número de colonias, *Chaetomium* spp. y *Trichotecium roseum*, seguidos de *Penicillium* spp. y *Alternaria alternata*. De los cuales solo este último tiene un comportamiento como parásito, produciendo necrosis en radícula y cuello.

En la micoflora interna (embrión) se han identificado un total de tres hongos: *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., y *Penicillium* spp., de estos, y como se ha indicado anteriormente, *Alternaria* y *Fusarium* son los más importantes y pueden provocar la destrucción del embrión.

El índice de contaminación obtenido utilizando el método de SOLDEVILLA (1995) es de 0,6, menor que la unidad, por lo que no podemos considerar que las semillas presenten una contaminación importante.

No se ha podido comprobar la patogenicidad de *Fusarium* en este ensayo, al obtener datos de mortalidad similares en lotes inoculados y en los testigos. Podría ser que la especie de *Fusarium* utilizada no tuviera un alto grado de patogenicidad.

En cuanto al ensayo de germinación y viabilidad de las semillas, si se ha observado un mayor porcentaje de germinación y viabilidad en las semillas desinfectadas en relación con las no desinfectadas (testigo).

Aunque de este trabajo no se puede deducir que los hongos de las semillas puedan producir una alta mortalidad de plántulas de *Pinus nigra* y por tanto provocar problemas de regeneración en el monte, si sería interesante en cualquier caso, aplicar ciertas medidas en viveros y semilleros, como la prevención de cualquier patología fúngica empleando sustratos y semillas libres de inóculos y un correcto almacenaje.

## 6. Bibliografía

- ALEJANO, R., ALVAREZ, L., MADRIGAL, A. y MARTÍNEZ, E.; 1997. Regeneración de *Pinus nigra* ssp. *salzmannii* en las Sierras Béticas. II Congreso Forestal Español. Pamplona. 15-20.
- BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B.; 1972. Illustrated genera of imperfect fungi (3rd Ed.). Minneapolis (U.S.A.): Burgess Publishing Company.



DEL CERRO, A., NAVARRO, R., LUCAS, M.E., ABELLÁN, M., GARCÍA, F.A. y LÓPEZ, F.; 2006. Factores que influyen en la difícil regeneración de los montes de *Pinus nigra* Arn., en la Serranía de Cuenca. Mont. 84: 33-39.

DEL CERRO, A. y LUCAS, M.E.; 2007. El *Pinus nigra* Arn. en la Serranía de Cuenca. Estudio sobre su regeneración natural y bases para su gestión. Castilla-La Mancha: Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Rural.

CLIMENT, J., CHAMBEL, M.R., DEL BLANCO, L., MARTÍNEZ, L. y ALÍA, R.; 2013. Esclareciendo la variación adaptativa entre subespecies y procedencias de *Pinus nigra* Arn. 6º Congreso Forestal Español, Vitoria.

HERRANZ, J. M., FERRANDIS, P., COPETE, M. A., y MARTÍNEZ, J. J.; 2002. Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. In. Agr.: Prod. Protec. Veg, 17(2), 229-245.

LUCAS, M. E., FONSECA, T., PARRESOL, B. R., SILVA-SANTOS, P., GARCÍA, F. A. & TÍSCAR, P. A.; 2011. Modelling Spanish black pine seedling emergence: Establishing management strategies for endangered forest areas. Forest Ecology and Management, 262(2): 195-202.

LUCAS, M.E., CANDEL, D., MOLERO, J., MONREAL, J.A., BOTELLA, O., RUBIO, A., AHRAZEM, O. y GÓMEZ, M.L.; 2013. La regeneración natural del pino laricio (*Pinus nigra* ssp *salzmannii*): Resultados después de quince años de investigación. 6º Congreso Forestal Español, Vitoria.

MUNTAÑOLA, M.; 1998. Guía de los hongos microscópicos. Editorial Omega, Barcelona.

MUÑOZ, C., COBOS, P., MARTÍNEZ, G., SOLDEVILLA, C. y DÍAZ, M.; 1996. Micoflora y patología del alcornoque (*Quercus suber* L.). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

MUÑOZ, C.; 1997. Problemática fitosanitaria en viveros para producción de planta para repoblaciones forestales. En OROZCO, E. y MONREAL, J.A. (eds.): Forestación en Tierras Agrícolas: 271-282. Universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca.

MUÑOZ, C., COBOS, P., MARTÍNEZ, G., SOLDEVILLA, C., MARTÍN, I. y DÍAZ, M.; 1997. Micoflora de los piñones de *Pinus pinea* L. en la C.A. de Madrid. Su implicación en las marras de los semilleros. II Congreso Forestal Español. Mesa 5. Pamplona. 307-312.

SÁNCHEZ, M.E. y TRAPERO, A.; 2003. Estado fitosanitario, etiología y control de enfermedades de semillas. En SÁNCHEZ, A., ARROYO, M. y NAVARRO, R.M. (eds.): Material Vegetal de Reproducción: Manejo, Conservación y Tratamiento: 149-174. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía.

SERRADA, R., DOMÍNGUEZ, S., SÁNCHEZ, M.I. y RUÍZ, J.; 1994. El problema de la regeneración natural del *Pinus nigra* Arn. Mont. 36: 52-57.

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

TÍSCAR, P.A.; 2005. Situación actual del conocimiento sobre la regeneración del *Pinus nigra* en la sierra de Cazorla y líneas de investigación futura. En GRANDE, M.A. y GARCÍA, A. (eds.): Los pinares de *Pinus nigra* Arn. en España: ecología, uso y gestión: 535-558. Madrid: Fundación Conde del Valle de Salazar.

TÍSCAR, P.A.; 2007. Dinámica de regeneración de *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* al sur de su área de distribución: etapas, procesos y factores implicados. In. Agr: Sist. y Rec. For. 16 (2): 124-135.