



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-078

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Estudio de la susceptibilidad de tres coníferas procedentes de la República Checa a *Fusarium circinatum*

ANETA LUKAČEVIČOVÁ ¹, JORGE MARTÍN-GARCÍA ², JUAN ASDRÚBAL FLORES-PACHECO ², JULIO DIEZ CASERO ², MILOŇ DVOŘÁK ¹

¹ Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Czech Republic

² Sustainable Forest Management Research Institute, University of Valladolid – INIA, Spain. Avda. Madrid, 44, 34001, Campus “La Yutera”, Palencia, España

RESUMEN

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell es el hongo patógeno causante del chancro resinoso del pino. Su presencia en Europa se restringe a la Península Ibérica, si bien su capacidad de dispersión amenaza al resto de masas europeas y viveros forestales. La susceptibilidad de tres especies de coníferas de gran importancia en la República Checa (*Pinus sylvestris*, *Picea abies* y *Larix decidua*) fue testada en condiciones de laboratorio frente a *F. circinatum*. Plántulas de 1,5-3 años fueron inoculadas en el tallo con una suspensión de esporas y mantenidas en cámaras de crecimiento. Los síntomas comenzaron a desarrollarse a los 34 días de ser llevadas a cabo las inoculaciones. El pino silvestre fue la única especie susceptible a *F. circinatum*, mientras que las otras dos especies mostraron plantas asintomáticas. Este hallazgo es alarmante para los bosques de la República Checa y deberá ser tenido en cuenta por sus autoridades fitosanitarias.

Palabras clave

Chancro resinoso del pino, *Gibberella circinata*, *Pinus sylvestris*, inoculación, suspensión esporal

1. Introducción

El chancro resinoso del pino causado por el hongo patógeno *Fusarium circinatum* (telemorfo = *Gibberella circinata*) Nirenberg and O'Donnell es una grave enfermedad afectando principalmente a especies de pinos a nivel mundial (Wingfield et al. 2008). La primera aparición tuvo lugar en Carolina del Norte (Estados Unidos) en 1945 (Hepting and Roth 1946) y no fue hasta la primera década del presente siglo cuando la enfermedad fue confirmada en Europa, en concreto en España (Landeras et al. 2005), Francia (EPPO 2006), Italia (Carlucci et al. 2007) y Portugal (Braganca et al. 2009). Su limitada distribución hace que *F. circinatum* sea actualmente un patógeno de cuarentena en Europa (EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pest). Sin embargo, bajo las actuales condiciones climáticas y la distribución de las especies consideradas susceptibles se estima que al menos 10 millones de hectáreas estarían amenazadas por *F. circinatum* (EFSA, 2010)

El chancro resinoso del pino es responsable de daños y mortalidad de árboles tanto de plántulas en vivero como de árboles adultos en el bosque, lo cual implica cuantiosas pérdidas económicas (Dwinell et al., 1985). La principal sintomatología consiste en chancros resinosos en el tallo principal y ramas laterales (Barnard and Blakeslee, 1987), si bien raíces, brotes, flores, piñas y semillas también pueden verse afectadas. Al menos 57 especies de pinos y el abeto rojo (*Pseudotsuga menziesii*) son consideradas susceptibles a *F. circinatum* (Gordon, 2013). Aunque la práctica totalidad de especies de pino estudiadas son consideradas susceptibles, algunas de ellas han mostrado cierto nivel de tolerancia en función de su procedencia (Hodge and Dvorak, 2000).

El pino silvestre (*Pinus sylvestris*) es una especie nativa en la República Checa, la cual cubre el 17 % de su superficie forestal (442.000 hectáreas) y tiene una gran importancia en su industria

maderera. El pino silvestre ha sido catalogado como especie susceptible, aunque sin graves daños, al chancro resinoso del pino (CABBI, 2014).

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar la susceptibilidad de tres importantes coníferas de procedencia Checa species (*Pinus sylvestris*, *Larix decidua* and *Picea abies*) a *F. circinatum*. Con la finalidad de conocer el daño potencial frente a una nueva introducción de dicho patógeno en las masas forestales de República Checa

3. Material y métodos

Los ensayos de patogenicidad fueron llevados a cabo sobre planta en envase (un año y medio *P. sylvestris* y *L. decidua* y tres años y medio *P. abies*). Dichas plántulas procedieron de semilla recolectada en bosques localizados a altitudes medias (500-600 m), temperaturas medias anuales de 6,5-7,5 °C y una precipitación anual media de 690 – 800 mm (Plíva, 1987). En concreto el pino silvestre de “South Bohemia”, la picea europea de “Middle Bohemia” y el alerce común de “Bohemian-Moravian Highland”.

Para la obtención de la suspensión esporal micelio del aislado FcCa6 de *F. circinatum* fue subcultivado en medio de cultivo PDA (Patata Dextrosa Agar) y mantenido a 25° C en oscuridad durante 7 días. Posteriormente cinco trozos (5 mm de diámetro) fueron adheridos a un matraz Erlenmeyer conteniendo medio de cultivo PDB (Caldo Patata Dextrosa) y mantenido en agitación a 180 ciclos por minuto durante 24 horas. La suspensión resultante fue filtrada con una grasa estéril y ajustada con un hemocitómetro a una concentración de 10⁶ esporas ml⁻¹ (Martínez-Álvarez et al., 2014).

Se inocularon 25 plántulas por especie, para lo cual se ocasionó una pequeña herida a 7 cm del cuello de la raíz y aplicaron 100 µl de la suspensión esporal, procediendo al posterior sellado mediante Parafilm® para evitar desecación y posibles contaminaciones. Del mismo modo, el tratamiento control fue similar pero aplicando la misma cantidad de agua destilada estéril (25 plántulas por especie). Las plántulas una vez inoculadas fueron mantenidas en condiciones controladas en cámaras de crecimiento (22,5° C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y riegos semanales).

Los daños fueron registrados cada 2-3 días usando como escala; 0 = sin daño, 1 = presencia de resina en el punto de inoculación, 2 = presencia de resina en el punto de inoculación y más allá, 3 = notable marchitamiento y 4 = planta muerta (Correll et al., 1991).

Para confirmar la presencia de *F. circinatum* en las plántulas inoculadas se procedió a su reaislamiento en cinco plántulas por especie seleccionadas de forma aleatoria. Para evitar que el patógeno se reaislase directamente del inóculo aplicado (lo cual podría considerarse un falso positivo), se procedió a analizar un trozo del tallo a dos centímetros del punto de inoculación. Para ello, se procedió a su esterilización: inmersión en agua destilada estéril 3 minutos, en hipoclorito sódico al 3% durante 2 minutos y en alcohol al 70% durante 2 minutos. Finalmente se procedió a su inmersión durante 5 minutos en agua estéril para eliminar los residuos de alcohol y otros compuestos (Martínez-Álvarez, 2015). Para la identificación del patógeno se utilizó el medio de cultivo SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) que favorece la presencia de circinos característicos de *F. circinatum*.

4. Resultados

El progreso de la enfermedad de las plántulas inoculadas en cada especie puede ser observado en las figuras 1. Diferencias entre especies son evidentes, comportándose como la especie más susceptible el pino silvestre. De hecho, se observó presencia de resina más allá de la herida al día siguiente de la inoculación (Figura 2). La presencia de marchitamientos comenzó a los 12 días de la inoculación lo que conllevó a su posterior muerte (Figura 3). Las plántulas de *P. abies* apenas mostraron daños. Únicamente dos plántulas presentaron exudaciones de resina más allá de la herida, lo cual tuvo lugar 20 días después de la inoculación. Las plántulas de *L. decidua* no mostraron síntomas hasta el final de la observación (34 días) más allá de una pequeña resinación fruto de la herida producida durante las inoculaciones. A pesar de no mostrar daños, en todas las plantas analizadas se realsió *F. circinatum* confirmando su presencia en dichas plantas en un estado latente. Por su parte, ninguna de las plántulas control mostró ninguna sintomatología.

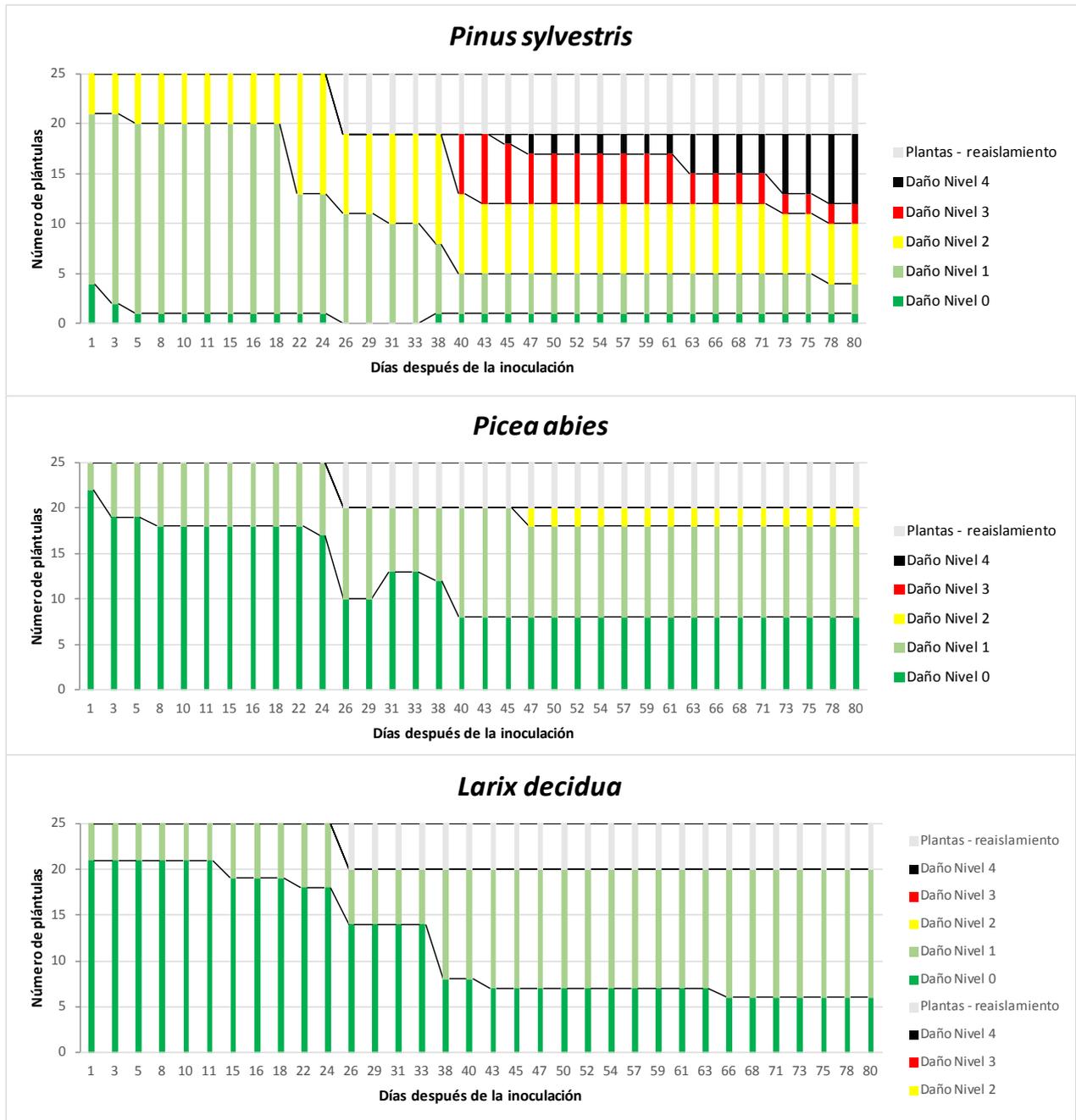


Figura 1. Progreso de la enfermedad de las plántulas inoculadas de (a) *Pinus sylvestris*, (b) *Picea abies* y (c) *Larix decidua*. Escala de nivel de daño: 0 = sin daño, 1 = resinación en el punto de inoculación, 2 = inoculación más allá del punto de inoculación, 3 = marchitamiento acentuado, 4 = planta muerta.



Figura 2. Detalles de la resinación más allá del punto de inoculación – nivel de daño 2.



Figura 3. Escala del nivel de daño en las plántulas de pino Silvestre. De izquierda a derecha: 1 = resinación en el punto de inoculación, 2 = inoculación más allá del punto de inoculación, 3 = marchitamiento acentuado, 4 = planta muerta.

5. Discusión

Este ensayo ha confirmado la susceptibilidad de una de las procedencias de *P. sylvestris* de la República Checa a *F. circinatum*. Este estudio es el primero que ha demostrado la susceptibilidad de una especie procedente de la República Checa al chancro resinoso del pino. Aunque la susceptibilidad de *P. sylvestris* fue previamente apuntada por algunos autores, si bien hay disparidad de resultados. Mientras Pérez-Sierra et al. (2007) y Enebak y Stanosz (2003) confirmaron su

susceptibilidad en plántulas de 6-8 meses y 3 años, respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos por Martínez-Álvarez et al. (2014) no confirmaron dicha susceptibilidad. Lo cual fue justificado por la influencia de muchos factores, incluyendo la procedencia y la edad de las plántulas.

La susceptibilidad de las otras dos especies (*Picea abies* and *Larix decidua*) no fue confirmada, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Martínez-Álvarez et al. (2014). Si bien, el hecho que dos plántulas de *P. abies* mostrasen resinación y que en todas las plántulas analizadas la presencia *F. circinatum* fuese confirmada más allá del punto de inoculación indica que se trata de plantas asintomáticas pero infectadas. Este hallazgo es de gran relevancia ya que se desconoce si la enfermedad se pudiera expresar en un plazo mayor de tiempo o bajo condiciones de estrés para la planta. Lo cual cobra incluso mayor relevancia si se confirma que el efecto del cambio climático someterá a muchas especies localizadas en zonas próximas a su umbral de necesidades a un estrés hídrico o de temperaturas. Por otro lado, lanza el interrogante de si plantas asintomáticas de especies consideradas no susceptibles podrían ser la vía de dispersión del patógeno a países libres del mismo.

6. Conclusiones

La procedencia Checa de *P. sylvestris* estudiada en este ensayo ha mostrado una clara susceptibilidad a *F. circinatum*. Por lo tanto este patógeno puede ser una grave amenaza para las masas de pino silvestre y los viveros forestales en la República Checa si llegase a introducirse en el país. Por otro lado, dicha dispersión podría verse favorecida por su presencia en plantas asintomáticas de otras especies consideradas a priori como resistentes a dicho patógeno.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación del “Ministry of education, youth and sports of the Czech Republic LD15046 Detection and biology of *Gibberella circinata* – essentials for early warning and management strategies in the Czech Republic” y por la COST Action COST FP1406 - Pine pitch canker - strategies for management of *Gibberella circinata* in greenhouses and forests (PINESTRENGTH) a través de una Short Term Scientific Mission.

Nos gustaría agradecer a Adam Szaniawski, Mariano Rodríguez y Raúl Arcadio Fernández su asistencia en las tareas de laboratorio. También quisiéramos dar las gracias a Wotan Forest a. s., Forest Nursery of Dvory nad Lužnicí, Czech Republic por facilitar las plántulas del ensayo.

8. Bibliografía

Barnard EL and Blakeslee GM, 1987. Pitch canker of southern pines. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Plant Pathology Circular No. 302, 4 p.

Bragança H, Diogo E, Moniz F and Amaro P, 2009. First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. Plant Disease 93, 1079.

CABBI, 2014. Invasive species compendium. On-line version, available at: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/25153>.

Carlucci A, Colatruglio L and Frisullo S, 2007. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). Plant Disease 91, 1683-1683.

- Correll JC, Gordon TR, McCain AH et al., 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75, 676–82.
- Dwinell LD, Barrows-Broadus J and Kuhlman EG, 1985. Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant disease (USA)* 69, 270-276.
- Enebak SA, Stanosz GR, 2003. Responses of conifer species of the Great Lakes region of North America to inoculation with the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum*. *Forest Pathology* 33, 333–8.
- EFSA, 2010. Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 8(6), 1620.
- EPPO, 2006. First report of *Gibberella circinata* in France. *EPPO Reporting services* 104(5).
- EPPO, 2016. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. On-line version, available at: <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>
- EPPO, 2017. *Fusarium circinatum* – Map of distribution. On-line version, available at: <https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/distribution>
- Gordon TR, 2013. Pitch canker. In: Gonthier P and Nicolotti G. *Infectious forest diseases*, CAB International 2013, London, UK.
- Hepting GH and Roth ER, 1946. Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry* 44, 742-744.
- Hodge GR and Dvorak WS, 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* 19, 241-258.
- Landeras E, Garcia P, Fernandez Y, Brana M, Fernandez-Alonso O, Mendez-Lodos S, Perez-Sierra A, Leon M, Abad-Campos P, Berbegal M, Beltran R, Garcia-Jimenez J and Armengol J, 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease* 89, 1015-1015.
- Martínez-Álvarez P, Pando V and Diez JJ, 2014. Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Plant Pathology* 63, 1086-1094.
- Martínez-Álvarez P, 2015. Environmentally friendly methods for the integrated management of pine pitch canker (PPC) disease. PhD thesis. University of Valladolid, 108 p.
- Nirenberg HI and O'Donnell K, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 434-458.
- 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, 832–9.
- Plíva A, 1987. Typologický klasifikační systém ÚHÚL (Forest typological system of the Forest Management Institute; in Czech). ÚHÚL Brandýs nad Labem, Czech Republic, 52 p.
- Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD and Coutinho TA, 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 37, 319-334.