

SUSCEPTIBILIDAD DE *PINUS PINASTER* A *FUSARIUM OXYSPORUM* EN CAMPO: VARIACIÓN FAMILIAR Y EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN

Patricia Martínez Garbín¹, Xoaquín Moreira Tome¹, Rafael Zas Arregui¹, Luis Sampedro Pérez¹ y Alejandro Solla Hach²

¹ Centro de Investigaciones Ambientales de Lourizán (CINAM). Apdo. 127. 36080-PONTEVEDRA (España). Correo electrónico: pmartins.cifal@siam-cma.org

² Ingeniería Técnica Forestal. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2. 10600-PLASENCIA (Cáceres, España). Correo electrónico: asolla@unex.es

Resumen

La infección natural en una parcela experimental de *Pinus pinaster* (n = 2.880 plantas) sometida a 9 tratamientos de fertilización ha permitido estudiar el efecto de la nutrición y del genotipo en la susceptibilidad a *Fusarium oxysporum*. El material consiste en 28 familias de polinización abierta procedentes de árboles plus seleccionados en masas naturales de la procedencia Galicia-Costa, y tres lotes de semilla comercial a modo de testigos. Los primeros síntomas de la enfermedad en las plantas se encontraron a los dos años de edad. Las plantas presentaban una clorosis aguda en las acículas con desecamiento de la yema terminal. Los síntomas mostraron una fuerte autocorrelación espacial que obligó al uso de técnicas de ajuste espacial para el correcto análisis. Los síntomas analizados mostraron diferencias significativas según el tratamiento de fertilización aplicado y el genotipo. Las plantas fertilizadas mostraron mayor sintomatología (clorosis foliar) que las no fertilizadas (30% vs 5%). Las familias mejoradas resultaron, en general, más afectadas que los testigos de semilla comercial. Se observaron agrupaciones sintomáticas en patorregiones de 30 a 90 metros de diámetro. Se ha observado que la mejora del estado nutricional de *P. pinaster* mediante una fertilización adecuada puede aumentar la sensibilidad del material. Esto tiene una repercusión práctica importante pues la fertilización de establecimiento en coníferas es ampliamente recomendada en los suelos pobres, arenosos y ácidos de Galicia.

Palabras clave: *Pino marítimo*, *Infección natural*, *Clorosis*, *Resistencia genética*, *Plasticidad*, *Autocorrelación espacial*

INTRODUCCIÓN

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una de las especies más importantes empleadas en repoblación forestal en Galicia, y por ello en la década de los 80 se inició en el CINAM-Lourizán un programa de mejora genética de esta especie. En el marco de este programa, y teniendo en cuenta que la nutrición es uno de los principales

factores que afecta a la productividad de los pinos en Galicia (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002), se establecieron ensayos factoriales familia x fertilización en diferentes localidades con el fin de analizar la variación genética en plasticidad frente a este factor ambiental.

F. oxysporum es un hongo saprofito causante de pudriciones y marchiteces, que tiene una importancia primordial en numerosos cultivos

agronómicos (COUTEAUDIER & ALABOUVETTE, 1981). Este hongo también es uno de los más frecuentes del complejo fúngico causante de la enfermedad del *damping-off* en viveros forestales y en ocasiones produce importantes daños en plantaciones muy jóvenes en campo (BLOOMBERG, 1981). *F. oxysporum* sólo se activa cuando las raíces de la planta huésped entran en contacto con el micelio, penetra en las raíces a través de heridas y se extiende por los vasos xilemáticos mediante crecimiento micelial y formación de microconidias que se transportan con el flujo ascendente de agua. Los síntomas foliares de las toxinas producidas por el hongo varían según el huésped, con acículas esparcidas y cloróticas o acículas retorcidas, seguidas por muerte descendente de puntas, síntomas de marchitamiento y achaparramiento conforme la enfermedad progresa (NELSON et al., 1981).

La presencia y daños causados por este patógeno en uno de los ensayos familia x fertilización nos permitió evaluar el efecto de la familia y de la fertilización de *P. pinaster* ante *F. oxysporum*. Al tratarse de una infección natural por un hongo, podemos esperar que la infección no sea homogénea sino que se produzcan focos de infección heterogéneos con parches de distinta intensidad en diferentes partes de la parcela. Los métodos convencionales requieren la independencia de las observaciones, y no permiten detectar, en ocasiones, diferencias entre tratamientos y familias si estas observaciones están espacialmente autocorrelacionadas. A través de la geoestadística, con ayuda de los semivariogramas y el método kriging, se puede explorar la estructura espacial de las variables, y en caso necesario, corregir la autocorrelación espacial que presenten mediante un proceso de análisis espacial iterativo (ZAS, 2006). Los objetivos de este trabajo fueron (i) evaluar la variabilidad familiar de la susceptibilidad de *P. pinaster* ante *F. oxysporum*, (ii) observar si esta susceptibilidad varía en función de la disponibilidad de nutrientes por parte del árbol, y (iii) describir el patrón de la infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló sobre un ensayo factorial familia x fertilización instalado en febrero

de 2004 en la zona interior de Galicia (Cea: 42,46° N 7,76° O, 520 m snm). La parcela tiene un clima atlántico con un cierto carácter mediterráneo con precipitaciones anuales moderadas (1127,1 mm), un periodo de sequía estival de 3 meses y una oscilación térmica intranual moderada. La parcela se sitúa sobre granitos con suelo franco-arenoso y ácido, rico en materia orgánica y N total (3,6 g.kg⁻¹), y pobre en otros nutrientes, especialmente en P asimilable (5,9 mg.kg⁻¹).

El material de mejora consistió en 28 familias de polinización abierta de *P. pinaster* procedentes de árboles *plus* seleccionados en la región de procedencia 1a Noroeste-Litoral y 3 familias testigo a partir de lotes de semilla comercial (T_{COS}, material identificado de la región de procedencia 1a Noroeste-Litoral; T_{INT}, material identificado de la región de procedencia 1b Noroeste-Interior; T_{SER}, material cualificado del huerto semillero mejorado de Sergude, A Coruña). La parcela se distribuyó conforme a un diseño *split-plot* replicado en 10 bloques, con 9 tratamientos de fertilización de establecimiento como factor principal y las familias como factor secundario. Los 9 tratamientos de fertilización de establecimiento se diseñaron por combinación de 4 abonos comerciales mono- y bi-elementales: N como nitrato amónico (5 g N.planta⁻¹), P como superfosfato triple (10 g P.planta⁻¹), K como sulfato potásico (15 g K.planta⁻¹) y Mg como sulfato magnésico (5 g Mg.planta⁻¹) según se indica en la figura 1. La fertilización se aplicó manualmente alrededor de las plantas en el momento de la plantación. El número total de plantas presentes en el ensayo fue de 2.790 plantas.

En diciembre de 2005 (dos periodos vegetativos después de la plantación) se observaron síntomas de clorosis en las acículas y marchitamiento de la yema terminal en muchas de las plantas del ensayo, por lo que se evaluaron diferentes variables de daño según la sintomatología encontrada en las plantas tras una prospección visual general. Se muestrearon destructivamente 10 plantas pertenecientes a un testigo comercial (T_{SER}), por ser este material una representación completa de la población de mejora presente en el huerto semillero de Sergude, con todo el sistema radical y suelo circundante según una escala gradual de daño. Estas muestras se llevaron a

analizar a la Estación Fitopatológica do Areiro (Pontevedra), la cual diagnosticó que las plantas analizadas estaban infectadas por *F. oxysporum*. Los resultados de los aislamientos mostraron esta patología infecciosa, sin embargo, no se comprobaron los postulados de Koch, puesto que no se inoculó ningún microorganismo del cultivo en una planta sana.

Se evaluó, durante el segundo y tercer periodo vegetativo, el aspecto general de todas las plantas vivas mediante dos variables cualitativas, coloración foliar y estado de la yema terminal. La coloración foliar se evaluó conforme a una escala gradual que varió entre 1 (plantas con todas sus acículas verdes), y 5 (plantas con clorosis en el 100% de las acículas). El estado de la yema terminal se evaluó según una escala binomial 0, yema viva, y 1, yema muerta.

Tras evaluar la distribución espacial de los datos mediante técnicas de geoestadística y comprobar que las variables estaban espacialmente autocorrelacionadas, se ajustaron las observaciones mediante el método de análisis espacial iterativo (ZAS, 2006) empleando el paquete estadístico SAS.

Una vez ajustadas las variables, la variación genética y el efecto de los distintos tratamientos de fertilización sobre la sintomatología de infección del hongo se analizaron mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS, considerando la interacción bloque x fertilización como factor aleatorio y el resto de los factores como fijos (LITTELL et al., 1996). Cuando los factores o interacciones resultaron significativos, las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron examinadas empleando el comando LSMEANS del procedimiento MIXED, asumiendo un nivel de significación de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de la infección por este patógeno fue elevada el primer año de las evaluaciones y más baja el segundo. El porcentaje de plantas con clorosis fue del 68% durante 2005 y 44% durante 2006. En cuanto al porcentaje de yemas muertas, el primer año de estudio fue de un 50% y de un 20% el segundo. Varios autores

encontraron que *F. oxysporum* predomina en suelos ácidos y arenosos, y que la infección es menor conforme aumenta la edad de las plántulas (KUBÍKOVÁ, 1968).

Durante los dos periodos vegetativos estudiados, las variables presentaron una estructura espacial agregada, con una semivarianza que disminuye a distancias cortas para las dos variables sintomáticas analizadas (Figura 2 A). Esto significa que los datos están autocorrelacionados, violándose el requisito de independencia de las observaciones, necesario en los métodos de estadística paramétrica convencional (ZAS, 2006). En la modelización *kriging* de los residuos de las variables se puede observar la elevada heterogeneidad ambiental existente tanto dentro de los bloques como dentro de los subbloques (Figura 2 B). La epidemia se mostró agregada en patorregiones de 29 m y 100 m de diámetro para la clorosis foliar y de 37 m y 95 m para la desecación de la yema terminal durante 2005 y 2006 respectivamente. Se impone la necesidad de corregir las variables mediante técnicas de ajuste espacial, puesto que si se obvia la heterogeneidad espacial podrían no encontrarse diferencias familiares, entre tratamientos o en la interacción familia x fertilización en las variables de ataque analizadas (datos no mostrados). Un trabajo previo en el que se evaluó el crecimiento de las plantas de esta parcela sin tener en cuenta la posible heterogeneidad espacial de los datos no obtuvo diferencias significativas (aún habiéndolas) ante los factores fertilización e interacción familia x fertilización (MARTÍNS, 2005). Otros trabajos también se apoyan en estas técnicas para evaluar adecuadamente la distribución espacial e incidencia de enfermedades como *Armillaria ostoyae* (ZAS et al., 2007).

El análisis de varianza realizado para las variables ajustadas mostró que los tratamientos de fertilización y la familia tuvieron un efecto altamente significativo sobre el grado de ataque de *F. oxysporum* en las plantas. También se encontraron diferencias altamente significativas en la interacción familia x fertilización en la valoración de la coloración foliar del segundo año (Tabla 1). Las familias mostraron diferencias significativas tanto en la coloración de las acículas como en el estado de la yema terminal, lo que indica que existen una serie de familias

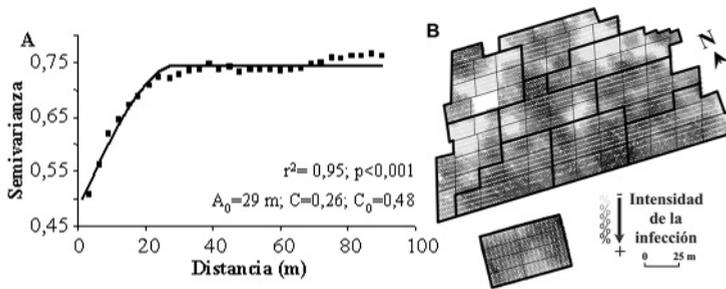


Figura 1. Tratamiento geoestadístico de la clorosis foliar observada en plántulas de *P. pinaster* de 3 savias afectadas por *F. oxysporum*. **A)** Semivariograma observado (puntos) y teórico (línea) de los residuos del modelo eliminando los efectos de los factores principales. Se indica el coeficiente de determinación y su significación, el rango (A_0), la varianza estructural (C) y el nugget (C_0). **B)** Modelización de la distribución espacial de los residuos mediante el método de kriging iterativo. La intensidad de la clorosis es mayor en las zonas más oscuras. Las líneas negras gruesas representan el límite de los bloques y las finas el de los whole plots

Factor	g.l.	Término Error	CF ₂₀₀₅	YT ₂₀₀₅	CF ₂₀₀₆	YT ₂₀₀₆
Fertilización (F)	8	TxB	23,2***	13,7***	4,0***	6,3***
Bloque (B)	9	TxB	0,1	0,1	0,3	0,1
Familia (G)	30	Error	3,1***	3,5***	2,7***	1,7**
GxF	240	Error	1,3**	1,2	1,1	1,0
GxB	270	Error	0,9	0,9	1,0	0,9

Tabla 1. Resultados del ANOVA realizado con los valores ajustados espacialmente para las variables clorosis foliar (CF) y estado de la yema terminal (YT), determinada en 2005 y 2006 en plántulas de *P. pinaster* afectadas por *F. oxysporum*. Se presentan los F ratios y los correspondientes niveles de probabilidad (***= $p < 0,001$, **= $p < 0,01$)

más resistentes al ataque de *F. oxysporum* que otras (Figura 3). Otros trabajos también señalan grupos de familias más resistentes al ataque de insectos dentro de esta misma población de mejora de *P. pinaster* en Galicia (ZAS et al., 2005). Comparando el comportamiento relativo de las familias testadas en el ensayo con respecto a los testigos, se observó que 19 familias mejoradas, de las 28 estudiadas (64%), mostraron mayor sensibilidad al ataque que los testigos de semilla comercial de costa e interior. Otros autores han evidenciado la superioridad del material de mejora frente al no mejorado en cuanto al crecimiento en altura, tanto en invernadero como en campo (ZAS & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2005; ZAS et al., 2005), pero si *F. oxysporum* fuera verdaderamente limitante en la supervivencia de las plantaciones gallegas, este aspecto habría de tenerse en cuenta en futuros ciclos de selección y mejora de *P. pinaster*.

La fertilización influyó significativamente en los daños ocasionados por *F. oxysporum*. En

relación al estado de la yema terminal, todos los tratamientos de fertilización incrementaron el daño en las yemas terminales frente al tratamiento control, especialmente el tratamiento completo T1 (Figura 1). Comparando los tratamientos T2 a T5 se observa una clara disminución de los daños en el tratamiento T4, lo que indica una influencia decisiva del K en beneficio del patógeno. Realizando comparaciones entre los distintos tratamientos de fertilización para la clorosis foliar durante el segundo periodo vegetativo se observó que tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno, las plantas fertilizadas con Mg mostraron menos clorosis, y que las plantas fertilizadas con K mostraron más clorosis (datos no mostrados). El efecto de la fertilización fosfórica sobre la clorosis foliar varió según se encontrase en presencia (beneficioso) o ausencia (perjudicial) de N. Las plantas fertilizadas con N mostraron mayor clorosis que las no fertilizadas. En este contexto, son varios los autores que han encontrado que la disponibili-

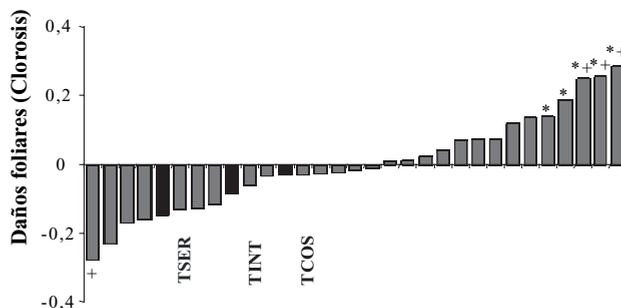


Figura 2. Desviación de la media familiar con respecto a la media general para la coloración foliar durante el segundo año. (* = familia significativamente distinta a TINT; + = familia significativamente distinta a TCOS)

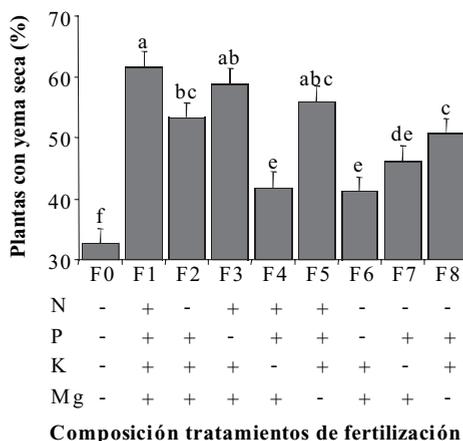


Figura 3. Porcentaje de plántulas de *P. pinaster* con la yema terminal seca debido a *F. oxysporum*, en cada tratamiento de fertilización. Las observaciones se realizaron en 2005 en plántulas de 3 savias. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Para cada tratamiento se indica la presencia (+) y ausencia (-) de cada compuesto

dad de nutrientes afecta en gran medida a la dinámica poblacional de plagas y proliferación de enfermedades (YERGEAU et al., 2006; ZAS et al., 2006). Varios autores afirman que los suelos ácidos con deficiencia en potasio y fertilización nitrogenada tienden a favorecer esta enfermedad (SMITH et al., 1988). BLOMBERG (1981) también encuentra que la elevada fertilización con nitrógeno incrementa la mortalidad de las plantas afectadas por *F. oxysporum* mientras que SINCLAIR et al. (1975) proponen el empleo de fertilizantes como una de las posibles herramientas para reducir las pérdidas por esta enfermedad. Dentro de esta misma población de mejora de *P. pinaster* en Galicia, ZAS et al., (2006) encontraron que la fertilización, en espe-

cial la fertilización fosfórica, incrementaba la intensidad de ataque de *H. abietis* en las plantas.

Estos resultados preliminares han de tomarse con cautela, pues se ha asumido la existencia de una sola cepa de *F. oxysporum* afectando la totalidad de la parcela, y no se ha realizado aislamientos en la totalidad de las 2.790 plantas. Es imprescindible explorar la estructura espacial de los datos al analizar patologías infecciosas en los ensayos de campo. En caso de encontrar que las observaciones están espacialmente autocorrelacionadas, el análisis de la sensibilidad familiar y de la nutrición en dispositivos experimentales en campo no es posible sin recurrir a técnicas de análisis espacial. Gracias a esta técnica se ha podido analizar el patrón de infec-

ción en la parcela experimental de campo, se ha observado que la fertilización mediante NPK aumenta significativamente los síntomas ante *F. oxysporum*, y que existe variación genética familiar en la susceptibilidad ante este patógeno.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado bajo la financiación del Proyecto INIA-RTA05-173. Se agradece la colaboración de P. Mansilla y de su equipo (Estación Fitopatológica do Areeiro) en la identificación del hongo.

BIBLIOGRAFÍA

- BLOOMBERG, W.J.; 1981. Disease caused by *Fusarium* in forest nurseries. In: P. E. Nelson, T. A. Tousson & R. J. Cook (ed.), *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*: 178-187. The Pennsylvania State University Press. Harrisburg.
- COUTEAUDIER, Y. & ALABOUVETTE, C.; 1981. *Fusarium* wilt in soilless culture. *Acta Horticulturae* 126: 153-158.
- KUBÍKOVÁ, J.; 1968. *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans. - A dominant fungus species on the root-surface of woody plant seedlings. *Plant Soil* 28(2): 306-312.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. & WOLFINGER, R.D.; 1996. *SAS System for mixed models*. SAS Institute. Cary, NC.
- MARTÍNS, P.; 2005. *Efecto de la fertilización de establecimiento en el comportamiento de familias de polinización abierta de Pinus pinaster*. Proyecto Fin de Carrera. EPS de Ingenieros de Montes. USC. Lugo.
- NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A. & COOK, R.J.; 1981. *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press. University. Harrisburg.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, F.; RODRÍGUEZ-SOALLEIRO, R.; ESPAÑOL, E.; LÓPEZ, C. A. & MERINO, A.; 2002. Influence of edaphic factors and tree nutritive status on the productivity of *Pinus radiata* D. Don plantations in northwest Spain. *Forest Ecol. Manage.* 171(1-2): 181-189.
- SINCLAIR, W.A.; COWLES, D.P. & HEE, S.M.; 1975. *Fusarium* root rot of Douglas-fir seedlings: suppression by soil fumigation, fertility management, and inoculation with spores of the fungal symbiont *Laccaria laccata*. *For. Sci.* 21(4): 390-399.
- SMITH, I.M.; DUNEZ, J.; LELLIOTT, R.A.; PHILLIPS, D.H. & ARCHER, S.A.; 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, England.
- YERGEAU, E.; SOMMERVILLE, D.W.; MAHEUX, E.; VUJANOVIC, V.; HAMEL, C.; WHALEN, J.K. & ST-ARNAUD, M.; 2006. Relationships between *Fusarium* population structure, soil nutrient status and disease incidence in field-grown asparagus. *Microbiol. Ecol.* 58(3): 394-403.
- ZAS, R. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2005. Juvenile genetic parameters and genotypic stability of *Pinus pinaster* Ait. open pollinated families under different water and nutrient regimes. *For. Sci.* 51(2): 165-174.
- ZAS, R.; SAMPEDRO, L.; PRADA, E. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2005. Genetic variation of *Pinus pinaster* Ait. seedlings in susceptibility to *Hylobius abietis* L. *Ann. For. Sci.* 62(7): 681-688.
- ZAS, R.; 2006. Iterative kriging for removing spatial autocorrelation in analysis of forest genetic trials. *Tree Genetics Genomics* 2(4): 177-186.
- ZAS, R.; SAMPEDRO, L.; PRADA, E.; LOMBARDELO, M.J. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; 2006. Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Ecol. Manage.* 222: 137-144.
- ZAS, R.; SOLLA, A. & SAMPEDRO, L.; 2007. Variography and kriging allow screening *Pinus pinaster* resistant to *Armillaria ostoyae* in field conditions. *Forestry* 80(2): 201-209.