



5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-503

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en semillas del género *Pinus*

MUÑOZ LÓPEZ, C.¹, CUERVO SÁNCHEZ, E.¹, AMPUDIA DÍAZ, M.¹, GASTÓN GONZÁLEZ, A.¹, PEÑUELAS RUBIRA, JL²., IGLESIAS SAUCE, S.², HERRERO SIERRA, N.²

¹ Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal. E.U.I.T. Forestal.

² Dirección General de Medio Natural y Política Forestal. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Resumen

La distribución de semillas del género *Pinus* es una potencial vía de dispersión del hongo patógeno *Fusarium circinatum*. Este organismo de cuarentena ha sido recientemente declarado en España, en plantas de vivero, en pies adultos y en semillas. Esta situación hace necesario diseñar un método de desinfección de semillas para minimizar la expansión del patógeno en España. Las semillas se han inoculado superficialmente con *F. circinatum* por inmersión en una solución de esporas de concentración conocida y a continuación se han tratado por inmersión en disoluciones de productos desinfectantes. Se han probado 10 materias activas (Hiplocorito Sódico 3.5%, Peróxido de Hidrógeno 30%, Tiram, Fludioxonil 2.5% + Metalaxil 1%, Piraclostrobina 5% + Metiram 55%, Metiram 80%, Tebuconazol 25% p/v, Metiltiofanato 70%, Clortalonil 72% p/v, 35% p/v de Mefenoxam) en semillas de 8 especies de pinos (*P.halepensis*, *P.pinea*, *P.pinaster*, *P.nigra* subsp. *nigra*, *P.nigra* subsp. *salzmanii*, *P.sylvestris*, *P.uncinata*, *P.canariensis*, *P.radiata*) con 3 tiempos de tratamiento (10, 20 y 30 minutos). La inoculación artificial ha generado lotes con el 100% de semillas contaminadas superficialmente por *F. circinatum*. Se ha evaluado la capacidad de desinfección de cada tratamiento y la influencia del mismo sobre la germinación. Dos productos, Peróxido de Hidrógeno al 30 % y Clortalonil 72% p/v, han conseguido niveles de desinfección próximos al 100%. La germinación no se ve afectada negativamente con ninguno de los productos ensayados.

Palabras clave

Fungicidas, desinfección, inoculación, Peróxido de Hidrógeno 30%, Clortalonil 72%.

1. Introducción

Fusarium circinatum Nirenberg et O'Donnell causa una gravísima enfermedad en coníferas, especialmente en el género *Pinus*. El hongo infecta una gran variedad de estructuras vegetativas y reproductoras, en diferentes estados de desarrollo dando lugar a diversos síntomas: importantes resinosis, mortalidad de las flores femeninas y de los conos maduros, deterioro de las semillas y mortalidad de las plantas en viveros.

La presencia de la enfermedad en el Norte de España se conoce desde mediados de los años noventa (1995-96), aunque la primera declaración oficial data de 2004 en un vivero de Asturias (LANDERAS et al, 2005). Al tratarse de un organismo de cuarentena en Europa, tras el comunicado oficial a la Comisión Europea, esta cita se convierte en la primera referencia pública de su presencia en nuestro continente. Recientemente se ha detectado en Apulia, al sur de Italia, en *Pinus pinea* y *Pinus halepensis* situados en parques urbanos y jardines (CARLUCCI et al, 2007).



A lo largo de estos últimos años, *Fusarium circinatum* se ha ido extendiendo por todo el Norte Peninsular, aislándose en montes y viveros de País Vasco, Navarra, Cantabria, Asturias y Galicia. Igualmente se han detectado positivos en otros puntos de España, en plantas para repoblación producidas en viveros de las Comunidades Autónomas ya afectadas.

La patogenicidad de los aislamientos obtenidos hasta el momento en nuestro país es elevada, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante ensayos de patogenicidad en plantas de *Pinus radiata* (MUÑOZ y AMPUDIA, 2005).

Las posibles diferencias de susceptibilidad entre nuestras especies de pinos autóctonas también se han puesto de manifiesto en unos primeros ensayos realizados (MUÑOZ et al, 2006).

La semilla es un importante y rápido vector de la enfermedad. Por lo que es urgente la puesta a punto de un protocolo eficaz y asequible que forme parte de las medidas rutinarias de desinfección del material reproductor, para evitar al máximo que los centros que lo suministran se conviertan en difusores involuntarios de la enfermedad.

BARNETT (1976) recomienda la utilización de peróxido de hidrógeno como un buen desinfectante de semillas de pinos del Sur de Estados Unidos, incluso como estimulante de la germinación en algunos de ellos. DWINELL (1999b) amplió los ensayos a más especies (incluyó *Pinus radiata*) y a más productos (Benomilo y Thiram) pero restringiéndolo a semillas infectadas por *Fusarium circinatum*. No encontró diferencias significativas entre productos, pero sí entre especies. Al menos en semillas de *P. radiata* y *P. palustris*, la infección por *F. circinatum* es fundamentalmente externa (DWINELL, 1999a y 1999b). ITURRITXA et al (2007) proponen el tratamiento de semillas con Folicur o Timol (aceite esencial de *Thymus zygis*) en combinación con aplicación de calor seco. LANDERAS et al (2006) también propone la aplicación de calor seco como método preventivo.

En todo caso desconocemos la aplicabilidad de los tratamientos citados u otros posibles para la mayoría de las especies de coníferas presentes en nuestro país. El trabajo que presentamos se ha llevado a cabo gracias a la financiación de la Dirección General de Medio Natural y Política Forestal del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino dentro de un convenio de colaboración entre dicho organismo y la EUIT Forestal de la Universidad Politécnica de Madrid.

2. Objetivos

Evaluar y seleccionar los métodos eficaces para la desinfección rutinaria de testas de semillas del g. *Pinus* contaminadas por *Fusarium circinatum*, cuantificando el efecto de los productos desinfectantes sobre la contaminación residual y la germinación de las semillas.

3. Metodología

Para los ensayos se han manejado semillas facilitadas, casi en su totalidad, por el C.N. de Mejora Forestal “El Serranillo”. Se ha trabajado con semillas de las siguientes especies: *P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. nigra nigra*, *P. nigra salzmännii*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. sylvestris*, *P. radiata*, y *P. uncinata*

El material fúngico elegido han sido cepas de *F. circinatum* de la micoteca del laboratorio de Patología Forestal de la E.U.I.T. Forestal de Madrid. Los ensayos con todos los desinfectantes elegidos se han realizado previamente inoculando externamente las semillas con una cepa aislada sobre *Pinus radiata* procedente de Asturias y codificada como F₁₃ (MAT-1).

Se han ensayado 10 productos desinfectantes. Para cada fungicida se ha elegido la dosis comercial recomendada por el fabricante, además se encuentran actualmente en el mercado y sus materias activas están incluidas en la “Lista A de materias activas admitidas por la Unión Europea”. Sin embargo para el agua oxigenada se ha ensayado la concentración del 30% y para la lejía una dilución al 20%, excepto para *P. pinea* que se utilizaron diluciones al 50% y 100%. En la tabla 1 se muestran los productos y concentraciones utilizadas en los tratamientos.

La metodología que se describe a continuación se ha llevado a cabo con todos los productos citados anteriormente, para todas las especies de pinos, con excepción de *P. radiata* y *P. uncinata* que sólo fueron tratados con Peróxido de Hidrógeno 30% y Clortalonil 72%.

Tabla 1: Materias activas y concentraciones utilizadas en la desinfección de *F. circinatum*. * Concentraciones utilizadas exclusivamente con *P. pinea*.

Materia activa	Nombre comercial	Concentración utilizada
Tiram 80%	Thisam 80	0.2%
Fludioxonil 2,5 % + Metalaxil 1%	Celest XL	0.1%
Piraclostrobina 5% + Metiram 55%	Cabrio Top	0.2%
Metiram 80 %	Polyram	0.2%
Mefenoxam 35%	Apron XL 350 ES	0.1%
Tebuconazol 25 %	Folicur 25 EW	0.1%
Metil tiofanato 70 %	Topsin 70	0.1%
Clortalonil 72 %	Bravo	0.16%
Peróxido de Hidrógeno 30%	Agua Oxigenada	30%
Hipoclorito de sodio 3,5%	Lejía	20% (50%-100%)*

Tras ensayos previos, se ha seleccionado un método de inoculación por inmersión y agitación, que garantiza unos niveles de contaminación elevados (probablemente superiores a los que puedan manifestarse en condiciones naturales) después de desechar otros sistemas, de esta forma también asegurábamos el poder desinfectante de los distintos compuestos. Este método está basado en la propuesta de AERGERTER & GORDON (2006) con alguna modificación.

El inóculo se preparó según lo expuesto por SCHMALE & GORDON (2003) ajustando la concentración a 10^4 conidios/ml.

Los tratamientos con los distintos productos se llevaron a cabo por inmersión y agitación de las semillas en el preparado durante 10, 20 y 30 minutos, dejándose sobre papel de filtro estéril hasta su secado. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con PDA y se introdujeron en incubadora a 24° C en oscuridad. Semanalmente y a lo largo de las 4 semanas se anotaron los resultados, contabilizando el número de semillas contaminadas y número de semillas germinadas en cada caso, incorporándolos a una base de datos para facilitar posteriormente su tratamiento matemático.

Se ha utilizado un diseño de experimentos factorial completo con 5 factores: especie (9 niveles), producto (10 niveles), tiempo (3 niveles), tratamiento (2 niveles), inoculación (2 niveles). En cada una de las combinaciones se han analizado 100 semillas tomadas aleatoriamente, tomando como variables dependientes el número de semillas contaminadas por *F.circinatum* y el número de semillas germinadas.

Para evaluar la eficacia en la eliminación de *F. circinatum* de los diferentes tratamientos se ha contabilizado el número de semillas inoculadas que siguen contaminadas tras el tratamiento. Estos datos se han analizado usando Modelos Lineales Generalizados (CRAWLEY, 2005). Los modelos se han ajustado usando la función *glm* de R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Se ha usado la familia *binomial* de *glm* cuando no se ha detectado sobredispersión y la *quasibinomial* en caso contrario, con función de enlace *logit* en ambos casos. Los modelos se han simplificado manualmente eliminando sucesivamente los términos más complejos no significativos ($\alpha = 0.05$) hasta que la reducción de la verosimilitud es significativa según una prueba de χ^2 o de *Fischer* (según hayamos usado la familia *binomial* o la *quasibinomial*). Para completar la interpretación de los datos se han calculado las medias para cada nivel de cada factor. Dado que las medias en este caso son proporciones, los intervalos de confianza se han calculado usando el método de Wilson, ya que el método clásico tiene un comportamiento inestable (NEWCOMBE, 1998a).

A diferencia del caso anterior, las semillas no tratadas han germinado en porcentaje variable según la especie o el lote. En este caso la variable estudiada ha sido el logaritmo neperiano de la tasa de cambio en el número de semillas que germinan tras aplicar el tratamiento como variable dependiente de un Modelo Lineal General (CRAWLEY, 2005). Los modelos se han simplificado como en el caso anterior. El análisis se ha completado comparando los porcentajes de germinación tras el tratamiento con el porcentaje observado sin tratamiento caso a caso (una comparación para cada especie, producto y tiempo). Para ello se ha utilizado el método propuesto por NEWCOMBE (1998b).

4. Resultados

Todas las muestras de semillas inoculadas y no tratadas han obtenido porcentajes de semillas contaminadas del 100%.

En cuanto al efecto del protocolo de tratamiento (producto y tiempo) en la contaminación de las muestras inoculadas y tratadas, el modelo ha retenido todos los factores como significativos y algunas interacciones también, es decir tanto el protocolo de

tratamiento de las semillas como la especie de pino a la que pertenecen influyen, pero esa influencia puede variar entre especies dado un protocolo concreto.

El porcentaje de semillas inoculadas que continúan contaminadas tras el tratamiento varía mucho según el producto usado: desde el 0,9% del Péroxido de Hidrógeno a 71,8 de Topsin (véase figura 1 y tabla 2). Dado que dos productos (Bravo y Peróxido de Hidrógeno) destacan en eficiencia sobre el resto se ha ajustado un modelo considerando estos dos únicamente. El modelo obtenido solo retiene dos factores: especie y producto, es decir un producto es significativamente mejor que otro (Peróxido de Hidrógeno produce contaminaciones tras el tratamiento menores que Bravo) y también existen diferencias significativas entre especies de pino.

Se ha ajustado un nuevo modelo descartando las semillas tratadas con Bravo y se ha obtenido un modelo con un único factor: la especie. La contaminación tras el tratamiento para *Pinus pinea* es significativamente mayor que para el resto de especies (véase tabla 3) y por lo tanto se ha analizado por separado. En la simplificación del modelo reajustado sin *P. pinea* todos los factores se han descartado por no ser significativos, es decir, la eficacia del Peróxido de Hidrógeno no varía significativamente entre especies y tiempos de tratamiento si no consideramos *P. pinea*.

Los datos correspondientes a *P. pinea* se han tratado siguiendo los mismos pasos expuestos hasta ahora. Al ajustar un modelo con los cuatro mejores productos (Folicur, Bravo, Peróxido de Hidrógeno e Hipoclorito de Sodio) no se ha observado diferencia significativa entre estos productos, ni entre los tiempos de tratamiento. Tampoco se han obtenido diferencias significativas aumentando la concentración de lejía hasta el 100%.

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la germinación de las semillas, se presentan únicamente los resultados para los dos productos más eficaces en la descontaminación de *F.circinatum* (Bravo y Peróxido de Hidrógeno). El modelo ajustado pone de manifiesto que todos los factores influyen, excepto el tiempo de tratamiento, es decir el cambio en la germinación debido al tratamiento depende de la especie, del producto, de si son semillas inoculadas o no y de sus interacciones.

A diferencia del análisis de datos de contaminación residual, en este caso no se han detectado patrones comunes a todas o la mayoría de las especies. Esta circunstancia nos ha llevado a analizar las diferencias entre los porcentajes de germinación tras el tratamiento y el porcentaje observado sin tratamiento caso a caso (una comparación para cada especie, producto y tiempo). Las tablas 4 y 5 muestran las diferencias y sus intervalos de confianza. El resultado más habitual es que la germinación no sufra cambios significativos (el intervalo de confianza incluye el 0, véanse tablas 4 y 5). En muchos casos la germinación no solo no empeora sino que mejora tras el tratamiento (el límite inferior del intervalo de confianza es mayor que 0). Los casos en los que la germinación disminuye significativamente tras el tratamiento (el límite superior del intervalo de confianza es menor que 0) son pocos y no siguen un patrón con respecto a las especies, los productos o los tiempos en los que sucede, de manera que se puede suponer que se deben a errores aleatorios en el proceso experimental.

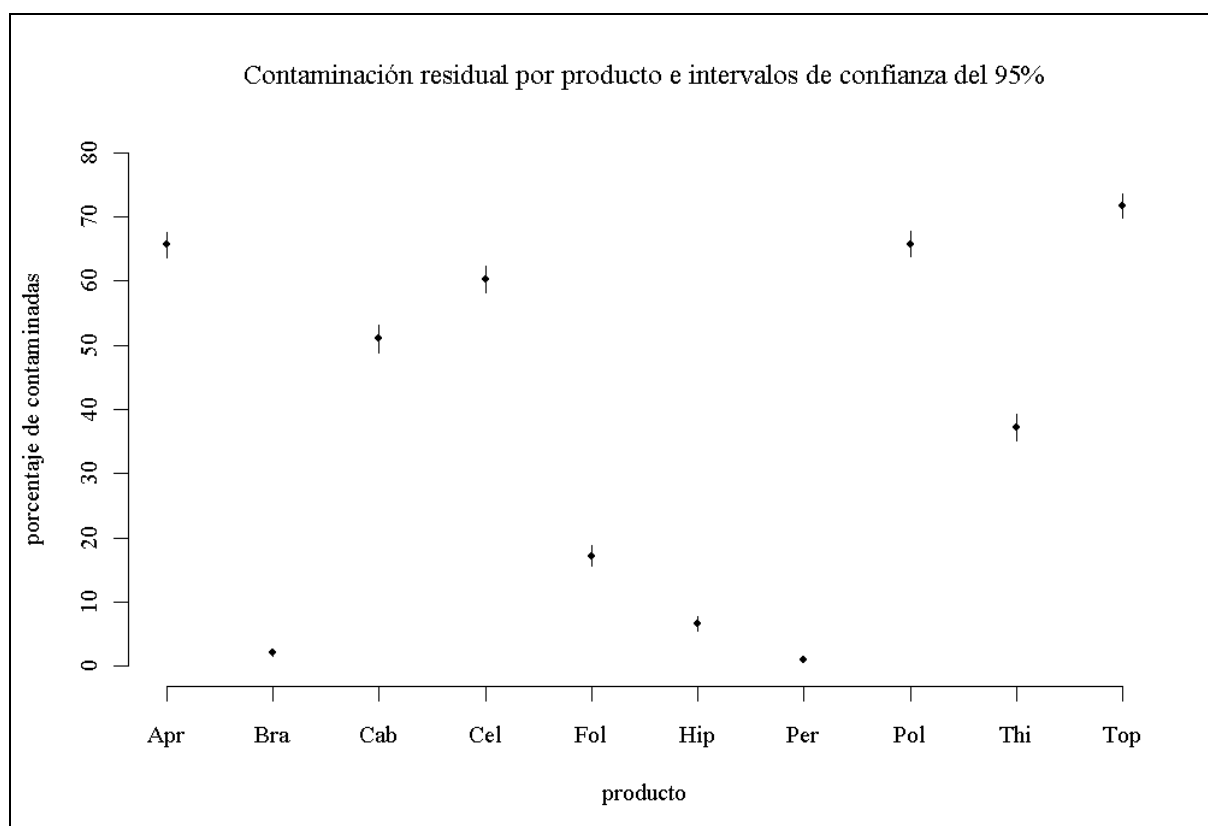


Figura 1. Porcentaje de las semillas inoculadas que continuaban contaminadas tras el tratamiento con cada producto (puntos) e intervalo de confianza del 95% (líneas verticales). Las abreviaturas son las tres primeras letras del nombre de los productos (véase tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de las semillas inoculadas que continuaban contaminadas tras el tratamiento con cada producto e intervalo de confianza del 95% (en cursiva).

Apron	Bravo	Cabrio	Celest	Folicur	Hipoclorito Sódico	Peróxido Hidrógeno	Polyram	Thisam	Topsin
65,7	2,1	51,0	60,3	17,0	6,5	0,9	65,8	37,2	71,8
<i>(63,6-67,7)</i>	<i>(1,6-2,7)</i>	<i>(48,9-53,1)</i>	<i>(58,2-62,4)</i>	<i>(15,5-18,7)</i>	<i>(5,5-7,7)</i>	<i>(0,6-1,3)</i>	<i>(63,8-67,8)</i>	<i>(35,2-39,3)</i>	<i>(69,8-73,6)</i>

Tabla 3. Porcentaje de las semillas inoculadas que continuaban contaminadas tras el tratamiento con Peróxido de Hidrógeno para cada especie e intervalo de confianza del 95% (en cursiva).

<i>P. canariensis</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>P. nigra nigra</i>	<i>P. nigra salzmannii</i>	<i>P. pinea</i>	<i>P. pinaster</i>	<i>P. radiata</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. uncinata</i>
0,0	0,0	0,0	1,3	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>(0-1,3)</i>	<i>(0-1,3)</i>	<i>(0-1,3)</i>	<i>(0,5-3,4)</i>	<i>(4,4-10,1)</i>	<i>(0-1,3)</i>	<i>(0-1,3)</i>	<i>(0-1,3)</i>	<i>(0-1,3)</i>

Tabla 4. Tabla de comparación de porcentajes de germinación. Se ha calculado el intervalo de confianza al 95% de la diferencia entre el porcentaje de germinación de cada tratamiento con Bravo frente al control sin tratamiento correspondiente. *(-) indica diferencia significativamente menor que 0, *(+) diferencia significativamente mayor que 0 y sin asterisco indica que la diferencia es no significativa.

sp.	tiempo	Semillas no inoculadas				Semillas inoculadas					
		% germinación		dif.	Int. conf.		% germinación		Int. conf.		dif.
trat.	control	inf.	sup.		trat.	control	inf.	sup.	trat.	control	
Pc	10	18	13	5	-5,20	15,20	14	8	6	-2,90	15,10
	20	11	13	-2	-11,30	7,30	10	8	2	-6,40	10,40
	30	7	13	-6	-14,80	2,60	15	8	7	-2,10	16,20
Ph	10	5	3	2	-4,20	8,50	7	8	-1	-8,90	6,80
	20	7	3	4	-2,60	11,10	5	8	-3	-10,60	4,30
	30	14	3	11*(+)	3,20	19,40	9	8	1	-7,20	9,30
Pnn	10	97	92	5	-1,70	12,30	92	90	2	-6,40	10,40
	20	95	92	3	-4,30	10,60	89	90	-1	-9,90	7,90
	30	92	92	0	-8,10	8,10	94	90	4	-3,90	12,20
Pns	10	86	85	1	-9,00	11,00	88	74	14*(+)	3,00	24,70
	20	88	85	3	-6,70	12,70	92	74	18*(+)	7,60	28,20
	30	92	85	7	-2,10	16,20	89	74	15*(+)	4,20	25,60
Ppa	10	10	20	-10	-20,00	0,00	4	3	1	-5,00	7,20
	20	6	20	-14*(-)	-23,50	-4,60	7	3	4	-2,60	11,10
	30	18	20	-2	-13,00	9,00	2	3	-1	-6,70	4,40
Ppt	10	29	33	-4	-16,60	8,80	36	16	20*(+)	7,80	31,50
	20	19	33	-14	-25,70	-1,70	40	16	24*(+)	11,60	35,50
	30	35	33	2	-11,10	15,00	37	16	21*(+)	8,70	32,50
Pr	10	61	21	40*(+)	26,60	51,30	47	18	29*(+)	16,10	40,60
	20	40	21	19*(+)	6,20	31,00	47	18	29*(+)	16,10	40,60
	30	34	21	13*(+)	0,50	25,00	51	18	33*(+)	19,90	44,50
Ps	10	99	97	2	-2,90	7,60	91	87	4	-5,00	13,10
	20	90	97	-7	-14,70	0,10	93	87	6	-2,60	14,80
	30	99	97	2	-2,90	7,60	49	87	-38*(-)	-49,00	-25,40
Pu	10	19	60	-41	-52,20	-27,80	60	36	24*(+)	10,10	36,70
	20	67	60	7	-6,30	20,00	60	36	24*(+)	10,10	36,70
	30	68	60	8	-5,30	20,90	68	36	32*(+)	18,20	44,10

5. Discusión

El método de inoculación artificial por inmersión en un concentrado de inóculo (10^4 conidios /ml) ha resultado muy eficaz para este estudio y otros futuros en los que se pueden precisar semillas altamente contaminadas.

En relación con el control químico de los distintos desinfectantes usados, nuestros resultados confirman lo expuesto por otros autores (BARNETT, 1976; DWINELL, 1999a y DWINELL, 1999b) respecto a la eficacia del Peróxido de Hidrógeno en la desinfección superficial de semillas afectadas por *Fusarium circinatum*, ampliando las conclusiones a la mayoría de las especies del género *Pinus* presentes en España.

Tabla 5. Tabla de comparación de porcentajes de germinación. Se ha calculado el intervalo de confianza al 95% de la diferencia entre el porcentaje de germinación de cada tratamiento con Peróxido de Hidrógeno frente al control sin tratamiento correspondiente. *(-) indica diferencia significativamente menor que 0, *(+) diferencia significativamente mayor que 0 y sin asterisco indica que la diferencia es no significativa.

sp.	tiempo	Semillas no inoculadas					Semillas inoculadas				
		trat.	control	dif.	Int. conf.		trat.	control	dif.	Int. conf.	
					inf.	sup.				inf.	sup.
Pc	10	68	7	61 *(+)	49,10	70,10	32	3	29 *(+)	19,00	38,90
	20	66	7	59 *(+)	47,10	68,30	34	3	31 *(+)	20,80	41,00
	30	65	7	58 *(+)	46,10	67,40	45	3	42 *(+)	31,10	52,00
Ph	10	21	8	13 *(+)	3,20	22,80	20	5	15 *(+)	5,90	24,40
	20	25	8	17 *(+)	6,70	27,10	11	5	6	-1,80	14,20
	30	41	8	33 *(+)	21,40	43,60	23	5	18 *(+)	8,50	27,60
Pnn	10	94	94	0	-7,30	7,30	98	100	-2	-7,00	2,00
	20	94	94	0	-7,30	7,30	95	100	-5 *(-)	-11,20	-0,30
	30	94	94	0	-7,30	7,30	97	100	-3	-8,50	1,20
Pns	10	80	85	-5	-15,60	5,70	89	62	27 *(+)	15,20	37,90
	20	82	85	-3	-13,40	7,50	86	62	24 *(+)	11,90	35,30
	30	69	85	-16 *(-)	-27,30	-4,30	91	62	29 *(+)	17,50	39,70
Ppa	10	4	8	-4	-11,50	3,10	6	3	3	-3,40	9,80
	20	5	8	-3	-10,60	4,30	6	3	3	-3,40	9,80
	30	7	8	-1	-8,90	6,80	3	3	0	-5,80	5,80
Ppt	10	28	24	4	-8,20	16,00	51	26	25 *(+)	11,50	37,30
	20	26	24	2	-10,00	14,00	62	26	36 *(+)	22,40	47,80
	30	34	24	10	-2,70	22,20	48	26	22 *(+)	8,50	34,40
Pr	10	78	38	40 *(+)	26,60	51,40	88	15	73 *(+)	61,50	80,60
	20	65	38	27 *(+)	13,10	39,50	70	15	55 *(+)	42,20	65,00
	30	78	38	40 *(+)	26,60	51,40	80	15	65 *(+)	52,80	73,80
Ps	10	96	93	3	-3,90	10,20	97	97	0	-5,80	5,80
	20	80	93	-13 *(-)	-22,60	-3,50	93	97	-4	-11,10	2,60
	30	87	93	-6	-14,80	2,60	97	97	0	-5,80	5,80
Pu	10	82	63	19 *(+)	6,60	30,70	74	23	51 *(+)	37,80	61,50
	20	75	63	12	-0,90	24,40	65	23	42 *(+)	28,50	53,30
	30	65	63	2	-11,20	15,10	80	23	57 *(+)	44,20	66,80

Sin embargo DWINELL (1999b) no encontró diferencia entre Thiram y Peróxido de Hidrógeno, para los que nuestros ensayos arrojan contaminaciones residuales medias muy diferentes: 37,2% frente a 1,7%. Esta circunstancia podría deberse a que las especies ensayadas y las formas de evaluar la eficacia de la desinfección fueron diferentes.

ITURRITXA et al (2007) obtuvieron eficacias prácticamente nulas para lejía al 20%, mientras que las obtenidas en nuestro trabajo son razonablemente buenas (contaminación residual tras el tratamiento 6,5%). Esto podría deberse a las diferencias en el tiempo de tratamiento (5 minutos frente a entre 10 y 30). Folicur, otro de los fungicidas recomendados por ITURRITXA et al (2007), ha obtenido resultados medios peores que la lejía en nuestro ensayo.

Los dos productos más eficaces según nuestros datos (Clortalonil 72% y Peróxido de Hidrógeno 30%) han obtenido contaminaciones residuales muy similares (apenas 1% de diferencia media si no se considera *P.pinea*) pero la diferencia es estadísticamente

significativa. En el caso de tener que elegir entre estos dos productos, el efecto favorecedor en la germinación del Peróxido podría ser otra buena razón para elegirlo. Este efecto favorecedor de la germinación ha sido observado en semillas de muchas especies de árboles (BARNETT, 1976). El Peróxido de Hidrógeno parece tener un efecto favorecedor en la germinación de las semillas de todas las especies.

De acuerdo también con nuestros resultados, fungicidas recomendados para el control de hongos del suelo incluido *Fusarium* spp., que se aplican a semillas y suelos semilleros de especies agrícolas han demostrado su total ineficacia contra *F. circinatum*, como son los casos del Metalaxil (Apron y Celest), Tiram (Thisam) o Metiltiofanato (Topsin).

Por otra parte, y con relación a la singularidad que presentan los resultados con *Pinus pinea*, podemos observar que para esta especie tanto Bravo como Folicur y lejía (diluída al 20%) pueden resultar si no totalmente, bastante eficaces. Al plantearnos un segundo ensayo con esta especie aumentando la concentración de lejía (dilución al 50% y 100%) hemos podido comprobar que la proporción de semillas contaminadas tras el tratamiento, no disminuye significativamente, pudiendo deberse al tamaño y peculiar estructura de sus testas.

Los resultados de eficiencia en la desinfección con peróxido de hidrogeno se han confirmado repitiendo el ensayo con 11 cepas distintas del hongo, tipificadas como MAT-1 y MAT-2 (datos sin publicar).

6. Conclusiones

De todos los productos desinfectantes ensayados, Peróxido de Hidrógeno y Clortalonil (Bravo) son los más eficaces contra *F. circinatum* en tiempos de tratamiento entre 10 y 30 minutos. Pero Peróxido de Hidrógeno es el mejor producto en promedio ya que obtiene contaminaciones residuales significativamente menores que Clortalonil y además favorece la germinación de las semillas.

Para la desinfección de semillas de *P. pinea*, Tebuconazol (Folicur), Clortalonil (Bravo) y Lejía pueden ser tan eficaces como el Peróxido de Hidrógeno, siempre teniendo en cuenta que persisten algunas contaminaciones residuales para esta especie.

Otros fungicidas ensayados, y recomendados para el control de hongos de suelo y tratamientos de semillas de cultivos agrícolas, incluido *Fusarium* spp., no han resultado efectivos contra *F. circinatum* (Tiram, Metiram, Metil tiofanato etc.).

7. Agradecimientos

Agradecemos a Elena Landeras del Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias y a Pedro Mansilla de la Estación Fitopatológica "Do Areeiro" (Pontevedra) por proporcionarnos algunas de las cepas de *Fusarium circinatum* utilizadas en este estudio y a Alejandro Vivar de la EUIT Forestal de Madrid por los consejos estadísticos.

8. Bibliografía

AEGERTER, B. J.; GORDON, T. R.; 2006. Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecol Manag* 235, 14-17.

BARNETT, J. P.; 1976. Sterilizing southern pine seeds with peroxide. *Tree Planters Notes* 27: 17-19.

CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L.; FRISULLO, S.; 2007. First Report of Pitch Canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Dis* 91(12), 1683.

CORRELL, J. C.; GORDON, T. R.; McCAIN, A. H.; KOEHLER, C. S.; WOOD, D. L.; SCHULTZ, M. E.; 1991. Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Dis* 75: 676-682.

CRAWLEY, M.J.; (2005). *Statistics: An Introduction using R*. John Wiley & Sons, Ltd. 342 pp.

DWINELL, L. D.; 1999a. Association of the pitch canker fungus with cones and seeds of pines. En: Devey, M. E.; Matheson, A. C.; Gordon, T. R, (eds.): Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. 35-39. Proceedings of IMPACT Monterey workshop. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Publishing, Collingwood, Victoria, Australia

DWINELL, D.L.; 1999b. Contamination of *Pinus radiata* seeds in California by *Fusarium circinatum*. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. November 1 - 4, 1999. San Diego, California.

ITURRITXA, E.; GARCÍA-SERNA, I.; GONZALEZ, I.; HEPPE, E.; AITKEN, J.; 2007. Efecto diferencial de los tratamientos fungicidas: sustancias químicas, aceites esenciales, antagonistas y termoterapia frente a *Sphaeropsis sapinea* y *Fusarium circinatum*. Aplicación de los tratamientos en la desinfección de semillas de *Pinus radiata*. Neiker. 32 pp. Vitoria.

LANDERAS, E.; GARCÍA, P.; FERNANDEZ, Y.; BRAÑA, M.; FERNANDEZ-ALONSO, O.; MENDEZ-LODOS, S.; PÉREZ-SIERRA, A.; LEÓN, M.; ABAD-CAMPOS, P.; BERBEGAL, M.; BELTRÁN, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J.; 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus spp.* in Northern Spain. *Plant Dis* 89, 1015.

LANDERAS, E.; ALZUGARAY, R.; BRAÑA, M.; 2006. Termoterapia en semilla de *Pinus spp.* y *Pseudotsuga menziesii* para el control de *Fusarium circinatum*. XXIII Reunión anual del grupo de trabajo fitosanitario de forestales, parques y jardines. Madrid.

MUÑOZ, C.; AMPUDIA, M.; 2005. Ensayos de patogenicidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D. Don. Actas del IV Congreso Forestal Español. Zaragoza.

MUÑOZ, C.; AMPUDIA, M.; GASTÓN, A.; 2006. Susceptibilidad de cinco especies ibéricas de pinos a *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. XXIII Reunión anual del grupo de trabajo fitosanitario de forestales, parques y jardines, Madrid.



NEWCOMBE, R. G.; 1998a. Two-sided confidence intervals for the single proportion: Comparison of seven methods. *Stat Med* 17, 857-872.

NEWCOMBE, R. G.; 1998b. Interval estimation for the difference between independent proportions: Comparison of eleven methods. *Stat Med* 17, 873-890.

R DEVELOPMENT CORE TEAM; 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SCHMALE, D. G.; GORDON, T. R.; 2003. Variation in susceptibility to pitch canker disease, caused by *Fusarium circinatum*, in native stands of *Pinus muricata*. *Plant Pathol* 52, 720-725.

