

Identificación de la micoflora asociada a semillas de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. conservadas *ex situ*

Identification of the micoflora associated with seeds of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. preserved *ex situ*

por

MARÍA EUGENIA PÁEZ-SÁNCHEZ¹; DIEGO DIAMONT-PÉREZ²,
JOSÉ REINALDO MORENO¹ y MILAGROS ARAUJO²

¹ Ministerio del Poder Popular para Ecosocialismo y Aguas,
Centro Nacional de Conservación de Recursos Genéticos.

² Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras,
Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.

RESUMEN

En Venezuela son pocas las investigaciones realizadas en relación a los microorganismos asociados a las semillas de árboles forestales, que pueden beneficiar o afectar a estas semillas. Por lo cual se planteó la evaluación de un lote de semillas de Caro (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.), las cuales estuvieron almacenadas durante dos años en el Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Conservación de Recursos Genéticos. Un total de 300 semillas se analizaron en el Laboratorio de Micología de la Unidad de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones Agrícolas del INIA-CENIAP. Las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril (ADE), separándolas en dos lotes de 150 semillas cada uno. El primer lote se colocó en bandejas con papel absorbente estéril y el segundo lote fue sembrado en medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) suplementado con sulfato de estreptomycin. Las semillas se incubaron durante ocho días a $25(\pm)3^{\circ}\text{C}$ y expuestas a ciclos alternados de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. A través de los microscopios estereoscópico y óptico de luz, las estructuras se compararon con la descritas en la literatura especializada, con lo cual se logró determinar la presencia de *Chaetomium globosum* sobre semillas de *Enterolobium cyclocarpum*.

PALABRAS CLAVE: *Chaetomium globosum*, banco de germoplasma, hongos, árboles.

ABSTRACT

In Venezuela there is little research done in relation to the microorganisms associated with the seeds of forest trees, microorganisms that can benefit or affect these seeds. Therefore, a sample of seeds of Caro (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.) The seeds were stored for two years in the Germplasm Bank of the National Center for the Conservation of Genetic Resources. A total of 300 seeds were analyzed in the Laboratory of Mycology of the Unit of Plant Protection of the Institute of Agricultural Research of INIA-CENIAP. The seeds were washed three times with sterile distilled water (EDW), separating them into two batches of 150 seeds each. The first batch was placed in trays with sterile absorbent paper and the second batch was seeded in culture medium of potato dextrose agar (PDA) supplemented with streptomycin sulfate. The seeds were incubated for eight days at $25(\pm)3^{\circ}\text{C}$ and exposed to alternating cycles of 12 h of darkness and 12 h of light. Through the stereoscopic and optical light microscopes, the structures were compared with those described in the specialized literature, with which it was possible to determine the presence of *Chaetomium globosum* on *Enterolobium cyclocarpum* seeds.

KEY WORDS: *Chaetomium globosum*, bank of germplasm, fungi, trees.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que las especies de árboles forestales son atacadas por diversos patógenos en viveros, plantaciones y también en bosques naturales. La calidad de las semillas plantadas tiene una influencia crítica sobre la capacidad de los cultivos para establecerse con pleno rendimiento y potencial. Muchas de las enfermedades en las plantas son transmitidas por las semillas ya que éstas son infestadas por hongos, bacterias y virus. Dentro de este grupo de patógenos 8.000 especies de hongos son capaces de producir un importante número de enfermedades en plantas con impacto considerable, muchos de ellos son patógenos importantes de semilla en maduración y reducen la calidad y germinación de las mismas (Grawatt 1931; Gibson 1957; Urosevic 1964; Jacobs 2009). Análisis micológicos han señalado 19 especies de hongos asociados a semillas de árboles forestales (Mehrotra 1998). Muchos de estos hongos incluyen saprófitos y patógenos débiles que disminuyen la calidad de las semillas reduciendo la germinación (Archana & Mehrotra 1982; Harper & Lynch 1981; Kirkpatrick & Bazzaz 1979). Sin embargo existen reportes que indican que algunos hongos producen sustancias que promueven la germinación y el crecimiento del embrión (Leelavathy 1969; Humphreys & Waid, 1963).

Por esta razón, es importante evaluar las condiciones fitosanitarias de las semillas y asegurar que las mismas estén libres de insectos plagas y fitopatógenos que afecten su viabilidad tanto en campo como en almacenamiento (ISTA, 1999). Una vez que los hongos están bien identificados, es esencial determinar la epidemiología del deterioro de la semilla. Estudios sobre los efectos de factores tales como: humedad relativa, temperatura y tiempo de almacenamiento

permiten proporcionar información básica para mantener la calidad de la semilla (Shea, s/f.). Para obtener éxito en programas de reforestación se debe contar con semillas en óptimas condiciones físicas, fisiológicas, genéticas y fitosanitarias (ISTA 1999; Terenti 2004, ISTA 2016), ya que ésta es la unidad biológica de propagación de la especie, la cual va a asegurar la obtención de plantas sanas para su establecimiento en campo (Borrajo 2006; Doria 2010). El Centro Nacional de Conservación de Recursos Genéticos (CNCRG), adscrito al Ministerio del Poder Popular para Ecosocialismo y Aguas, tiene entre sus actividades la conservación e investigación sobre la diversidad biológica del país, así como la realización de la colecta, procesamiento y almacenamiento de semillas de especies forestales presentes en Venezuela, útiles en los distintos programas asociados a la conservación de especies botánicas de interés ecológico y económico. *E. cyclocarpum*, cuya legumbre se caracteriza por ser curva formando un círculo helicoidal completo, presenta amplia distribución en América Tropical, y en Venezuela se encuentra en las zonas cálidas del norte del país, entre los 0 y 900 m.s.n.m (Llamozas *et al.* 2003; Hokche *et al.* 2008, Schnee *et al.* 2010), La especie es empleada en reforestación de áreas con suelos degradados por ser una leguminosa que fija nitrógeno y forma micorrizas, su semilla es empleada en la alimentación animal e incluso humana (Serratos *et al.* 2008; Hernández *et al.* 2011). Esta especie está considerada vulnerable por su extracción para ser empleada en la construcción rural, elaboración de implementos agrícolas y muebles; así como por la eliminación de bosques (Llamozas *et al.* 2003). Debido a que en Venezuela no existe información precisa vinculada a un programa de evaluación fitosanitaria de semillas

de especies forestales y al escaso conocimiento sobre su incidencia en la propagación de árboles, el CNCRG y el INIA-CENIAP a través de los laboratorios de la Unidad de Protección Vegetal, se plantearon el análisis micológico de semillas de *E. cyclocarpum* preservadas por un lapso dos años a una temperatura de 10 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 300 semillas de caro-caro (*E. cyclocarpum*), almacenadas durante dos años a una temperatura de 10 °C, en el banco de germoplasma del Centro Nacional de Conservación de Recursos Genéticos adscrito al Ministerio del Poder Popular para Ecosocialismo y Aguas. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Micología de la Unidad de Protección Vegetal del INIA-CENIAP. Se seleccionaron al azar dos lotes de semillas de 150 cada uno, el primero de ellos se colocó sobre papel absorbente secante estéril humedecido con agua destilada estéril (ADE), dentro de bandejas plásticas envueltas con envoplast transparente. El otro lote de semillas se lavó con abundante agua estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron cinco semillas por cápsula de Petri, las cuales contenían medio papa dextrosa agar (PDA) suplementado con sulfato de estreptomycin para inhibir el crecimiento bacteriano. Las bandejas y cápsulas de Petri se incubaron durante ocho días a 25±3 °C y expuestas a ciclos alternados de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. Al octavo día de incubación, las muestras se examinaron con microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4 (8-32X) y se realizaron observaciones de preparados microscópicos utilizando colorantes vegetales para la tinción de las estructuras fúngicas (González *et al.* 2011). Las micro y macrofotografías se

realizaron con una cámara digital marca Leica® acoplada a microscopio modelo Leica DW1000. Con la ayuda de literatura especializada se pudo determinar la especie del hongo presente sobre la testa de la semilla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos del análisis micológico realizado, se pudo observar que en ambos métodos en más del 65 % de las semillas se observó crecimiento de estructuras fúngicas, 66 % en papel absorbente y 100 % en PDA, las cuales se describen a continuación: Ascocarpos en forma de peritecio subgloboso con ostiolo en el extremo superior, cubierto de setas terminales, ubicados sobre la testa de las semillas de caro-caro (**FIGURA 1**). El peritecio de 142-170 x 104-161 µm, con setas terminales en la parte superior de 3.7- 4.5 µm de ancho y tricomas rizoidales en la parte basal (**FIGURA 2**). En el corte longitudinal del peritecio se pudo observar ascas hialinas, clavadas y evanescentes, de 42-73 x 11-12 µm; con 8 ascosporas de color marrón en forma elipsoidal o esféricas, unicelulares de 9-10,5 x 6,0-8,9 µm (**FIGURA 3**). Estas características permitieron identificar al espécimen como un ascomicete, de la familia Chaetomiaceae, orden Sordariales, género *Chaetomium*, especie *C. globosum*. Este resultado representa el primer reporte de este hongo en semillas de caro-caro. Una vez realizada la caracterización morfológica e identificación del hongo, se procedió a preparar muestras de semillas con las estructuras del hongo para enviar al Herbario Micológico “Albert S. Muller” (VIA) y se realizaron aislamientos en PDA, para su conservación en el Cepario del Laboratorio de Micología de la Unidad de Protección Vegetal del INIA-CENIAP.

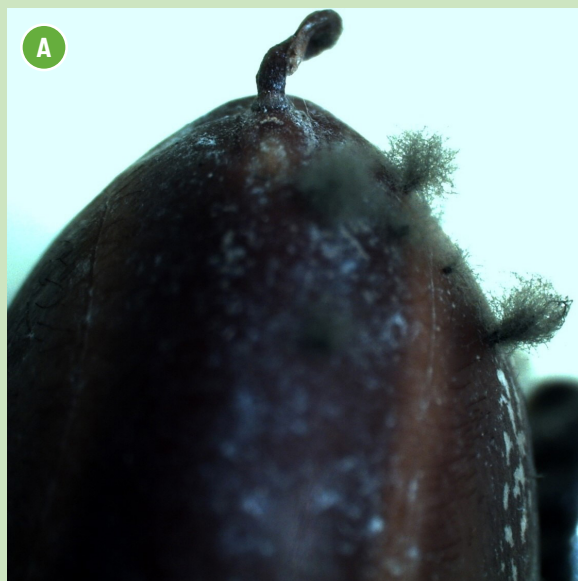


FIGURA 1. (A) Semilla de caro-caro mostrando peritecios subglobosos del hongo *Chaetomium globosum*, (B) detalle de las setas terminales de dicho peritecio.



FIGURA 2. Peritecio subgloboso del hongo *Chaetomium globosum*, mostrando setas terminales dispuestas apicalmente y tricomas rizoidales ubicados basalmente. 40x.

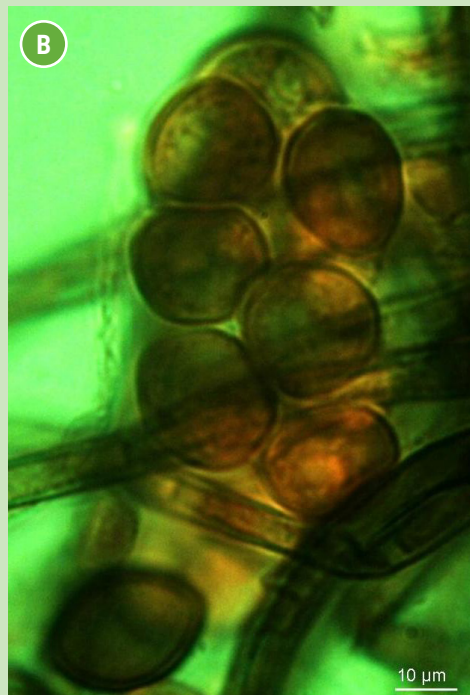
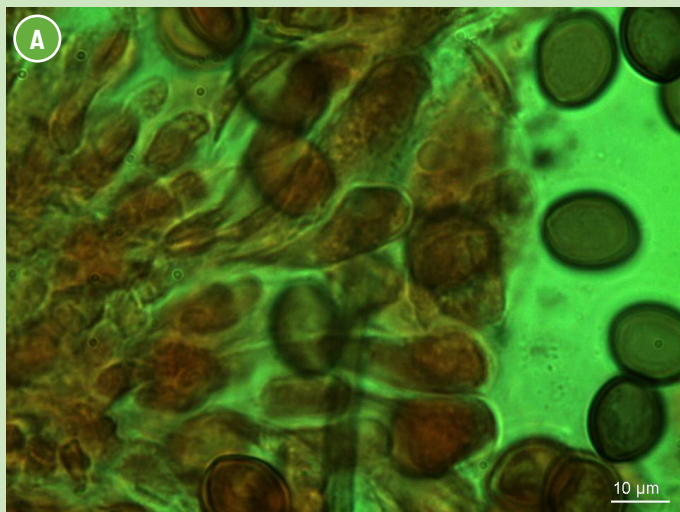
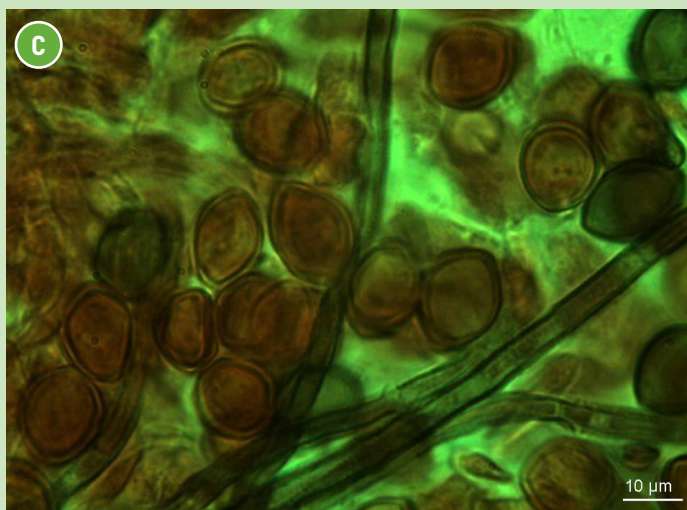


FIGURA 3. (A) Ascas hialinas y clavadas de *Chaetomium globosum*, (B) detalle de ascas con ascoporas en su interior y (C) ascoporas unicelulares y elipsoidales, 100x



C. globosum ha sido reportado con capacidad de degradar la celulosa (Hawksworth & Wells 1973, Troya *et al.* 2000); otras investigaciones señalan su capacidad patogénica, endòfita y saprofita en diferentes especies de plantas (Kubatova 2006; Wang *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2013). Por otro lado esta especie se ha señalado en semillas de árboles forestales como eucalipto (Pérez-Vera *et al.* 2005), araguaney (Diamont *et al.* 2013) y moringa (Martínez de la parte *et al.* 2013). En todo caso quedaría por demostrar la influencia de *C. globosum* sobre la calidad de la semilla de *E. cyclocarpum* y evaluar las condiciones de almacenamiento de las mismas, ya que la mayoría de los hongos que invaden a la semilla almacenada crecen en un rango de temperatura entre 25 y 28 °C. Por lo tanto, dentro de los límites de crecimiento de los hongos, cuanto mayor sea el contenido de humedad y la temperatura, más corto es el tiempo que se puede almacenar sin efectos adversos (Chulze 2010). Es

importante señalar que en este análisis no hubo crecimiento de otros hongos que comúnmente crecen sobre semillas almacenadas. Según Schmidt (2000), los hongos que pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* constituyen los principales agentes que afectan a las semillas en condiciones de almacenamiento. En tal sentido, investigaciones en semillas almacenadas de *Leucaena leucocephala* reportan una lista importante de especies fúngicas tales como *Rhizopus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Apiospora montagnei*, *Arthrinium euphorbiae*, *Aspergillus fumigatus*, *Curvularia clavata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Fusarium pallidoroseum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium chrysogenum* y *Phoma* sp (Soetrismo 2003). En la literatura revisada para el género *Enterolobium* no se señala información acerca de los efectos que ejerce *Chaetomium* sobre la calidad de la semilla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archana, S.; Mehrotra B. S. 1982. Mycoflora Associated with the Seeds of Forest Trees and Their Effect on Germination Proc. Indian man. Sci. Acad. B. 48(5): 706-713.
- Borrajo, C. I. 2006. Curso Internacional en Ganadería Bovina Subtropical. Reconquista, Argentina. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/.. /78-borrajo.pdf.
- Chulze, S. N. 2010. "Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review". Food Additives & Contaminants: Part A, 27(5): 651-657.
- Diamont, D., Márquez. M.; Pérez, D.; Subero, L. 2013. Detección de hongos asociados a semillas de especies de árboles forestales de interés en Venezuela. XXIII Congreso Venezolano Fitopatología. Venezuela. Recuperado de <https://sites.google.com/site/ideafitopatologia2013/home/resumenes-socializados/trabajos-por-temas/forestales>.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento Cultivos Tropicales. 31(1): 74-85.
- Gibson I. A. S. 1957. Saprophytic fungi and destroyers of germinating pine seeds; E. African. Agric. J. 22: 203-206.

- González, M.; D. Diamont.; B. Gutiérrez. 2011. Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante. *Biagro*. 23(1): 65-68.
- Grawatt, A. E. 1931. Germination losses of conifer seeds due to parasites; *J. Agric. Res.* 42:71-92.
- Harper, S. H.; Lynch, J. M. 1981. Effects of Fungi on Barley Seed Germination *Journal of General Microbiology*. 122: 55-60.
- Hawksworth, D.; H. Wells. 1973. Ornamentation on the terminal hairs in *Chaetomium* Kunze ex Fr. and some allied genera. *Mycological Papers*. 134: 1-24
- Hernández, N.; Tizado, C.; Him, Y.; Díaz J.G.; Torrealba, E.; Rodríguez, Z. 2011. Evaluación de tratamientos pregerminativos para estimular la emergencia en cuatro especies forrajeras arbóreas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2011, 28 Supl. 1: 536-546
- Hokche, O.; P. E. Berry; O. Huber. 2008. Nuevo catalogo de la flora vascular de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Venezuela. 833 p.
- Humphreys, J. D. R.; Waid, J. S. 1963. Influence of fungal isolates on germination and growth of perennial ryegrass *Plant Soil*. 19: 139-150.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*. 27: 302 p. Recuperado de <https://www.seedtest.org/.../instructions-to-contributors-content>.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2016. Recuperado de https://www.seedtest.org/en/instructions-to-contributors_-_content--1--1089.html.
- Jacobs, K. A. 2009. Charter 4 diseases of woody ornamental and in nurseries edit by Ronald, K. Jones and D. Michael Benson. 23 p.
- Kirkpatrick, B. L.; Bazzaz, F. A. 1979. Influence of Certain Fungi on Seed Germination and Seedling Survival of Four Colonizing Annuals *Journal of Applied Ecology* (16)2: 515-527.
- Kubatova, A. 2006. *Chaetomium* in the Czech Republic and notes to three new records. *Czech Mycology. Publication of the Czech Scientific Society for Mycology*. 58(3-4): 155-171.
- Kumar, S.; N. Kaushik; P. Proksch. 2013. Identification of antifungal principle in the solvent extract of an endophytic fungus *Chaetomium globosum* from *Withania somnifera*. *Springerplus*. 2:37.
- Leelavathy, K.M. 1969. Effect of rhizosphere fungi on seed germination *Plant Soil*. 30: 473-476.
- Llamozas, S.; R. D., Stefano.; W. Meier.; R. Riina.; F. Stauffer.; G. Aymard.; O. Huber; R. Ortiz. 2003. Libro Rojo de la Flora Venezolana. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Dr. Tobías Lasser. Venezuela. 558 p.
- Martínez de la Parte, E.; Cantillo, P. T.; García, R. D. 2013. Micobiota asociada a lotes importados de semillas de moringa (*Moringa oleifera*). *Fitosanidad* 17(3):125-129.
- Mehrotra, M. D. 1998. Punam Singh *Indian Journal of Forestry*. 21(4): 345-354.

- Pérez-Vera, O. A.; M. de J. Yáñez-Morales.; D. Alvarado-Rosales.; D. Cibrián-Tovar; S. E. García-Díaz. 2005. Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*. 39(3): 311-318.
- Schnee, L; Leal, F.; Benítez, C. E. 2010. El Manual de Plantas Comunes de Venezuela de Ludwig Schnee. Ediciones de la Facultad de Agronomía Universidad Central de Venezuela. Venezuela. 765 p.
- Schmidt, L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Ed. K. Olensen. Danida Forest Seed Centre. Denmark. 511 p.
- Serratos, A. J. C.; Carreón A. J.; Castañeda, V. H.; Garzón de la Mora, P.; García, E. J. 2008. Composición químico-nutricional y de factores antinutricionales en semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Interciencia*. 33(11):850-854.
- Shea, K. R. s/f. Mold Fungi and Their Relation to Forest Tree Seed. Recuperado de https://nprn.rngr.net/publications/proceedings/1960/mold-fungi-and-their-relationship-to-forest-tree-seed/at_download/file.
- Soetrismo, H. 2003. The importance of storage conditions in the management of forest tree seed diseases and damping off in Indonesia. Recuperado de <http://www.metla.fi/iufro/iufro95abs/d2pap89.htm>.
- Terenti, O. 2004. Calidad de semilla, qué implica y cómo evaluarla. E.E.A. INTA San Luis, Informativo Rural 1(2). Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo.../27-calidad-semillas.pdf
- Troya, T.; D. Muñoz-Mingarro.; F. Linares.; C. Rodrigues-Borrajo.; Yuste.; F. Rubio. 2000. Detección de actividades enzimáticas lignocelulolíticas de *Chaetomium* spp. *Invest. Agr. Sist. Recur. For.* 9: 5-15.
- Urosevic B. 1964. More important seed borne diseases of Czechoslovak forest trees. Proc. FAO/I.U.F.R.O. Symposium of internationally dangerous forest diseases and insects, Oxford. 22: 203-206.
- Wang Y.; L. Xu.; W. Ren.; D. Zhao.; Y. Zhu.; X. Wu. 2012. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*. 19: 364-368.