



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales

**Evaluación de la patogenicidad de *Sphaeropsis sapinea*  
(Fr.) Dyko & Sutton colectado en material de *Pinus radiata*  
*D. Don*, en Valdivia y la Costa de Arauco**

Patrocinante: Sr. Moisés Osorio O.

Trabajo de Titulación presentado  
como parte de los requisitos para optar  
al título de **Ingeniero Forestal**.

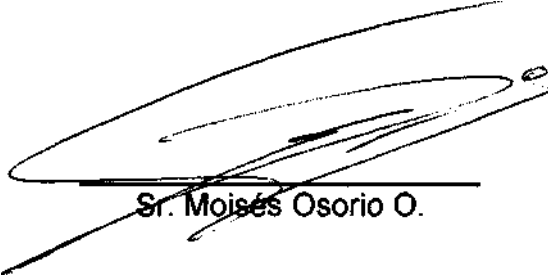
**RODRIGO ALEJANDRO MORALES RAMÍREZ**

VALDIVIA  
2007

## CALIFICACIÓN DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

		<b>Nota</b>
<b>Patrocinante:</b>	<b>Sr. Moisés Osorio O.</b>	<b><u>6.6</u></b>
<b>Informante:</b>	<b>Sr. Víctor Gerding S</b>	<b><u>5.1</u></b>
<b>Informante:</b>	<b>Sr. Angélica Aguilar V.</b>	<b><u>6.0</u></b>

El patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.



Sr. Moisés Osorio O.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Centro de Análisis y Desarrollo de Resistencias Fúngicas (CADEREF) UACH-Fundación Chile, por el financiamiento para realizar este estudio.

Mis agradecimientos a los profesores Víctor Gerding y Angélica Aguilar por sus aportes y comentarios constructivos para el Trabajo de Titulación, y en especial al profesor Moisés Osorio patrocinante de este Trabajo de Titulación.

Por último mis sinceros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma estuvieron vinculadas a este Trabajo, gracias.

A mi familia

## ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes generales	2
2.2 Taxonomía del hongo	2
2.3 Sintomatología	4
2.4 Condiciones que favorecen la epifítia	4
3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	5
3.1 Material	5
3.1.1 <i>Colecta de material</i>	5
3.1.2 <i>Características edafoclimáticas de las zonas de colecta</i>	6
3.2 Método	7
3.2.1 <i>Aislamientos</i>	7
3.2.2 <i>Diseño de los ensayos fisiológicos</i>	8
3.2.3 <i>Diseños de los ensayos de patogenicidad</i>	9
3.2.4 <i>Análisis morfológico</i>	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Aislamientos	12
4.2 Análisis de ensayos fisiológicos	12
4.3 Evaluación de la patogenicidad	15
4.4 Análisis morfológico	17
5. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23
SUMMARY	
ANEXOS	
1. Análisis estadístico del ensayo fisiológico	
2. Análisis estadístico del ensayo de patogenicidad	
3. Análisis estadístico de las variables largo y ancho de esporas.	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación geográfica de las zonas de estudio y puntos de colecta de material	5
2	Esquema de diseño del ensayo fisiológico	8
3	Esquema de diseño del ensayo de patogenicidad	10
4	Inóculo y aislamientos de <i>S. sapinea</i>	12
5	Crecimiento de una misma cepa de <i>S. sapinea</i> en medios de cultivo diferentes	13
6	Crecimiento diametral acumulado de las cepas de <i>S. sapinea</i> de ambas procedencias en los tres medios de cultivo ensayados	14
7	Crecimiento diametral promedio y comparación estadística de las colonias de <i>S. sapinea</i> de ambas procedencias (al cuarto día) en los tres medios de cultivo ensayados (n=25)	14
8	Ensayo de patogenicidad de <i>S. sapinea</i>	15
9	Avance promedio de cada cepa de <i>S. sapinea</i> de ambas procedencias (n=10)	16
10	Estructuras morfológicas de <i>S. sapinea</i>	17
11	Largo promedio de las esporas de <i>S. sapinea</i> de ambas procedencias (n=20)	18
12	Ancho promedio de las esporas de <i>S. sapinea</i> de ambas procedencias (n=20)	19
13	Tipos de esporas de <i>S. sapinea</i> encontrados en el estudio	19
14	Comparación de tamaño de esporas de <i>S. sapinea</i> de cada procedencia de estudio	20

## RESUMEN EJECUTIVO

En el presente estudio se evaluaron cepas del hongo *Sphaeropsis sapinea* provenientes de la zona de Arauco y de Valdivia. El fin de comparar ambas procedencias fue debido a que en la zona de Arauco este hongo se asocia a severas epifitias en plantaciones de *Pinus radiata*, mientras que en la zona de Valdivia este hongo tendría una forma más bien saprofitica sobre desechos en el bosque. Para establecer la comparación entre procedencias se colectó material con presencia del hongo, y se utilizaron cinco cepas por procedencia. La evaluación fue a través de ensayos fisiológicos, probando el crecimiento de las cepas en tres medios de cultivo nutricionalmente diferentes: Agar Malta, Agar Papa Dextrosa y Agar Agua.

Se realizaron ensayos de patogenicidad probando la virulencia de las cepas sobre plantas de *P. radiata* de dos meses de edad, las que fueron inoculadas con el hongo en la zona apical de éstas. La variable a medir fue el avance del hongo en la planta, y los datos fueron analizados por medio de estadística descriptiva e inferencial.

También se efectuaron comparaciones morfológicas realizando mediciones de largo y ancho de esporas. Los resultados de los ensayos fisiológicos en los medios de cultivo probados no registró diferencias significativas en los promedios de crecimiento en las cepas de ambas procedencias. El ensayo de patogenicidad tuvo una duración de tres semanas, tiempo en el hongo tardó en dar muerte a las plantas y no se registraron diferencias significativas en cuanto a la agresividad, es decir las cepas de *S. sapinea* utilizadas, presentaron igual grado de virulencia. Se registraron diferencias significativas en las variables medidas de las esporas, pero los rangos de medición de estas variables se encuentran dentro de los descritos por la literatura. Aunque se registraron diferencias de tamaño en las esporas, en los ensayos fisiológicos y de patogenicidad no se detectaron diferencias que lleven a sospechar de cepas con mayor o menor grado de virulencia.

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista fitosanitario, las plantaciones forestales en Chile se han desarrollado con éxito, debido a que el país presenta barreras geográficas naturales a lo largo y ancho del territorio, favoreciendo la salud de los bosques gracias a la condición de isla fitosanitaria. Aún con esta particularidad, en las últimas décadas se han reportado ingresos de nuevas plagas y enfermedades al país, poniendo en riesgo al recurso forestal existente.

*Pinus radiata* es la principal especie de carácter económico para el país. Actualmente las plantaciones de esta especie abarcan una superficie de 1,8 millones de hectáreas, lo que genera cierta preocupación frente a eventuales problemas por plagas y enfermedades que podrían causar graves pérdidas económicas para el país.

Dentro de los agentes dañinos para el recurso forestal presentes en Chile se destaca *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton, hongo causante de la enfermedad conocida como “muerte regresiva de los pinos”. Esta enfermedad provoca muerte apical y de brotes, malformaciones, canchros y muerte de los árboles. Actualmente *S. sapinea* en la zona de la costa de Arauco, se asocia a masivos ataques, produciendo canchros en árboles jóvenes y mortalidad en plantaciones de *P. radiata* de distintas edades. En cambio en Valdivia *S. sapinea* presenta un rol aparentemente saprófito. Una comparación de ambas procedencias del hongo permitiría analizar si se trata de cepas diferentes patogénica y morfológicamente. En función de ello se abordaron los siguientes objetivos:

- Caracterizar y comparar morfológica y fisiológicamente cepas de *S. sapinea* provenientes de la costa de Arauco y de Valdivia.
- Evaluar y comparar la patogenicidad de cepas de *S. sapinea* aisladas de muestras provenientes de las dos zonas de estudio.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes generales

*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton anteriormente denominado *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx es un hongo causante de la enfermedad llamada “muerte regresiva de los pinos”. Esta enfermedad provoca la muerte apical y de brotes, malformaciones en árboles, canchales y muerte del hospedante (Chou, 1976a; Osorio, 1977; Nicholls y Ostry, 1990).

Este hongo fue descrito por primera vez en Francia, en el año 1842, sobre hojas muertas de *Pinus sylvestris* (Waterman, 1943). Es un parásito oportunista de coníferas de distribución mundial. Como hospedantes preferentes se encuentra las especies del género *Pinus*, dentro del cual *P. radiata* es la especie que presenta una alta susceptibilidad (Chou, 1976a; Dick, 1999).

En Chile fue reportado primeramente por Mujica en 1942 en *Abies pinsapo* en la comuna de Contulmo, VIII Región (González y Jorquera, 1997), y sobre *P. radiata* por Osorio en 1973 en muestras provenientes de la zona de arenales, donde venía ocurriendo una severa epifitias desde inicios de la década de los setenta (Osorio, 1977). Actualmente *S. sapinea* se distribuye desde la V a la X Región, preferentemente en todo el rango geográfico que cubren las plantaciones de *P. radiata*, registrándose los mayores ataques del hongo en la VII y VIII Región, en esta última región se han reportado las mayores epifitias (Osorio y Sobarzo, 1986).

### 2.2 Taxonomía del Hongo

El hongo *S. sapinea* pertenece a la división Deuteromycota y orden Sphaeropsidales, de la clase Coelomycetes. La particularidad de este grupo es que presentan fructificaciones que corresponden a picnidios que crecen aislados o en grupos compactos, inmersos en el tejido del hospedante (Sutton, 1980; Barnett y Hunter, 1987; Agrios, 1996), son de color negro y están provistos de una abertura denominada ostiolo. Los picnidios miden aproximadamente entre 200 a 550  $\mu\text{m}$ , los que se forman inmersos sobre acículas, ramas, corteza y escamas seminíferas. Del interior de éstos, emergen masas de esporas o conidios, agrupados en forma espiralada denominados cirrus, de color negro. Los conidios, son estructuras de disseminación del hongo, de color café oscuro y de dimensiones de 30 a 45  $\mu\text{m}$  de largo y de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de ancho, presentando un tabique central. Las dimensiones varían según el grado de madurez de los conidios al igual que el color y presencia del tabique (Punithalingam y Waterston, 1970; Osorio, 1977; Sutton, 1980; Butín y Peredo, 1986). Respecto a las dimensiones de esporas de *S. sapinea* Swart y Wingfield (1991) y Cedeño *et al.* (2001) señalan que existe confusión en la literatura respecto a los rangos establecidos por los investigadores.

El desarrollo del hongo en el árbol, es a través de hifas, que se desplazan por el tejido medular y en sentido de los radios medulares. Las hifas son de color café

oscuro, pero por efecto óptico en la madera se observa como un azulado causando manchado en la madera (Osorio, 1977; Chou y MacKenzie, 1988).

En condiciones de laboratorio y en estudios fisiológicos, el hongo se desarrolla en un rango óptimo de temperatura entre 24 a 28° C en medios de cultivo agarizados. Varios autores señalan que estos tipos de medios estándar son adecuados para los aislamientos de *S. sapinea*, destacándose los medios de cultivo de Agar Malta y Agar Papa Dextrosa (Chou, 1976a; Palmer y Nicholls *et al.*, 1987; Sobarzo, 1983). En estudios realizados para identificación entre especies de *Diplodia* y *Sphaeropsis* se ha encontrado que dependiendo del medio de cultivo que se utilice o de la aplicación de vitaminas al medio, puede variar la morfología y desarrollo del hongo *in vitro* a igual temperatura (Webster y Hewitt, 1969).

Dentro de *S. sapinea* han sido reconocidos dos grupos en base a la morfología de los cultivos (Palmer *et al.*, 1987; Swart y Wingfield, 1991; Blodgett y Bonello, 1999). El primer morfotipo identificado lo denominaron tipo A, que corresponde al más conocido y extendido en el mundo. Crece más rápido en medio agarizado y produce un abundante micelio aéreo, en un principio blanquecino tornando a verde gris a medida que madura. El segundo morfotipo se denominó tipo B, y se identificó en el Norte Central de Estados Unidos. En medio agarizado presenta un desarrollo más lento en comparación con el morfotipo A, de micelio gris oscuro y la colonia crece presionada sobre la superficie de agar (Swart y Wingfield, 1991; Cedeño *et al.*, 2001; Madenabeitia, 2004). Estos dos morfotipos se diferenciaron en análisis de isoenzimas y DNA polimórfico amplificado al azar. Actualmente ambos morfotipos son detectables por análisis RADP (Blodgett y Bonello, 2003).

En observaciones de esporas en microscopio electrónico de barrido, se encontró que el morfotipo A presenta pared lisa y en ensayos de patogenicidad es agresivo tanto sobre brotes del año como sobre tejido lignificado. En cambio el morfotipo B la pared es rugosa, presentando porosidad y su patogenicidad fue menos agresiva que el morfotipo A (Palmer *et al.*, 1987; Blodgett y Stanosz, 1999).

Osorio (1977) encontró que el mayor porcentaje de germinación se obtenía con un 100% de humedad relativa y temperaturas entre los 15 y 26° C siendo su óptimo sobre los 20° C. En preparaciones este autor obtiene cerca del 80% de germinación en tres horas. Similar estudio realizó Chou (1981) respecto a la germinación de esporas sobre la superficie de acículas de plantas en laboratorio a 25°C, en comparación con esporas germinadas en preparaciones. Del estudio dedujo que sobre la superficie de las acículas disminuye la germinación a un 38,4 % en 24 horas, posiblemente por baja en el contenido de humedad de la suspensión de esporas aplicada, o debido a sustancias inhibitoras sobre las acículas generadas por la cutícula, en comparación a preparaciones donde obtuvo un 70,3 % de germinación en seis horas.

### 2.3 Sintomatología

La enfermedad se hace perceptible solo cuando los tejidos del ápice, ramas y brotes, están moribundos o muertos, presentando clorosis junto a resinación en la zona afectada. Posteriormente se presenta necrosis del follaje, lo que ocurre meses después de la penetración e incubación de la enfermedad. Este hongo puede atacar plantaciones de *P. radiata* de distintas edades. Peterson (1981) señala que en Estados Unidos el daño fue severo y principalmente en especies de pinos después de los 30 años de edad. Contrariamente Chou (1977) encontró que en plantaciones de *P. radiata* los ataques disminuyen después de los siete años de edad, y posteriormente los árboles parecen adoptar mayor resistencia al ataque del hongo. En Chile Sobarzo (1983) detectó que las plantaciones más atacadas son aquellas cuyas edades fluctúan entre los diez y veinte años, encontrándose también en plantaciones mayores y menores con menos frecuencia. En árboles adultos la enfermedad se presenta como muerte regresiva. En plantaciones jóvenes un ataque de *S. sapinea* puede producir malformaciones y multiflechas debido a la muerte y desecamiento del ápice encorvándose en forma de jota invertida, pasando a tomar la dominancia brotes secundarios. A esta enfermedad también se le atribuye la formación de canchales que corresponden a lesiones localizadas en la corteza, en ramas y fuste, originando áreas depresivas que son visibles en algunos árboles sin que exista avance de la lesión o se produzca muerte del follaje (Marks y Minko, 1968; Nicholls y Ostry, 1990; García y Diez, 2003).

### 2.4 Condiciones que favorecen la epifitía

El desarrollo de la enfermedad se ve favorecido por factores de predisposición que pueden afectar el grado de susceptibilidad y resistencia de *P. radiata*. En este sentido, *S. sapinea* es común encontrarlo viviendo en forma saprofitica, en cortezas, conos y ramas, presentando un rol descomponedor. Este comportamiento deja en claro que para que se manifieste un comportamiento parasítico, se deben dar condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, siendo uno de los factores claves el medioambiente. El hongo es particularmente activo en climas calurosos, por este motivo algunos patólogos lo denominan como un hongo termófilo. Por otra parte, se han realizado estudios en que asocian el ingreso del hongo a árboles debido a heridas como lo son daños al fuste y en ramas por granizo o a faenas sylvícolas como la poda, lo que facilita el ingreso del patógeno en zonas donde existen reportes de la enfermedad (Chou, 1976 b; Nicholls y Ostry, 1990; García y Diez, 2003, Madenabeitia, 2004). Estudios asocian a deficiencias nutricionales, problemas de compactación y erosión como factores de predisposición para el desarrollo de la enfermedad. Chou (1976 b), señala que epifitias causadas por *S. sapinea* en Nueva Zelanda, se presentaron principalmente en suelos deficientes de boro. De igual manera, Osorio (1977) señala que en Chile en suelos formados por arenas andesítico - basálticas, que presentan deficiencias nutricionales de boro y potasio, serían condiciones que favorecerían el desarrollo de la enfermedad.

### 3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Colecta de material

Se colectó material de *P. radiata* con presencia de signos de *S. sapinea*, proveniente de la costa de Arauco y de Valdivia, Chile. En la costa de Arauco se colectó material en cuatro predios cercanos a la costa pertenecientes a particulares, ubicados entre los 37°27" y 37°35" latitud Sur y 73°20" y 73°48" longitud Oeste. En estos puntos de colecta se obtuvo material de árboles que presentaban signos característicos del hongo (picnidios), en rodales donde se manifestaba la enfermedad (figura 1).

En Valdivia el material colectado fue de desechos de faenas silvícolas y de árboles muertos, en cuatro predios, de los cuales tres pertenecen a la Universidad Austral de Chile: los predios Los Pinos y Las Palmas ubicados al norte de Valdivia, y el predio Los Ulmos ubicado al sur de Valdivia camino viejo a La Unión. El cuarto predio pertenece a Aguas Décimas ubicado en la comuna de Corral, sector alto de Quitaluto (figura 1). La localización geográfica de estos predios está entre los 39°44" y 40°18" latitud Sur y 73°10" y 73°22" longitud Oeste. Aunque en Valdivia no se han registrado brotes de la enfermedad causada por *S. sapinea* en plantaciones de *P. radiata*, en el predio Quitaluto el material se colectó de árboles muertos en pie, encontrándose signos del hongo sobre éstos.

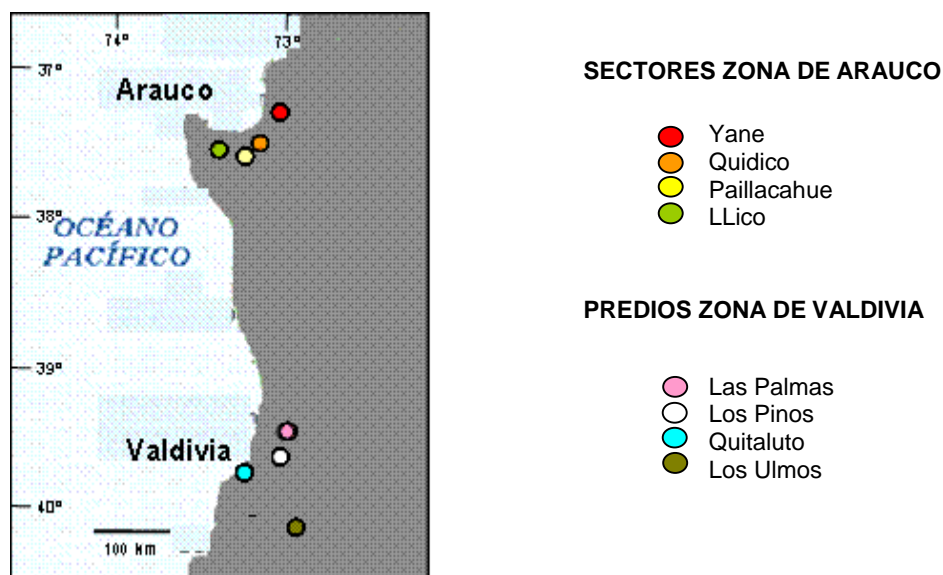


Figura 1. Ubicación geográfica de las zonas de estudio y puntos de colecta de material

### *3.1.2 Características edafoclimáticas de las zonas de colecta*

La zona de Arauco presenta un clima Templado Mesotermal Mediterráneo con influencia marina. La precipitación media anual es de 1.467 mm, distribuyéndose mayormente en los meses de mayo a septiembre. Los meses con mayores precipitaciones son junio y julio, con 150 mm promedio de lluvia caída. El período de estación seca es de cuatro a seis meses, donde ocasionalmente se registra precipitación. La temperatura media anual es aproximadamente de 13°C (Fuenzalida, 1971).

El suelo en los sectores de colecta de material pertenece a la serie Pantoja, que es un miembro de la Familia franca fina, mixta, térmica de los Mollic Haploxeralfs (Alfisol). Son suelos bien evolucionados, derivados de materiales metamórficos o roca metamórfica y que se presenta en una posición topográfica de cerros y/o lomajes, con pendientes moderadas a muy fuertemente onduladas (10 a 30% de pendiente). En los primeros 15 cm de profundidad la textura es franca a franca arcillosa y presenta estructuras granulares medias o finas. En profundidad la textura es franco arcillosa hasta 45 cm de profundidad y arcillosa hasta la roca subyacente, la densidad aparente se encuentra entre 0,7 y 1,1 g/cm<sup>3</sup>. En la superficie se presenta buen arraigamiento asociado a una alta porosidad del tipo fino; en profundidad los poros finos se hacen comunes al igual que las raíces. La permeabilidad es de drenaje moderado y de escurrimiento superficial rápido (Martínez, 2004).

La zona de Valdivia presenta un clima Templado Lluvioso de Costa Occidental con Influencia Mediterránea (Fuenzalida, 1971). Se caracteriza por la irregularidad de las precipitaciones y distribución mensual y anual fluctuante, destacándose en general que todos los meses presentan pluviosidad, siendo los meses estivales no secos y los invernales muy húmedos (Huber, 1970; Fuenzalida, 1971). La precipitación anual es de 2.400 mm, registrándose las máximas en junio y julio de 410 mm aproximadamente, y en ocasiones supera esta cantidad (Huber, 1970). En el caso del predio Quitaluto las precipitaciones superan en promedio los 4.000 mm anuales, registrándose en los sectores de mayor altitud, entre los 400 y 600 ms.n.m, alrededor de 5.000 mm anuales en la Cordillera de la Costa (Donoso, 1993).

La temperatura media anual en Valdivia oscila entre 11 y 12 °C (Schlegel y Martínez, 1987). La variación de las temperaturas medias mensuales no es tan marcada, debido a la regulación térmica ejercida por la influencia oceánica.

El suelo en los predios Los Pinos, Las Palmas y Los Ulmos pertenece a la serie Los Ulmos (Typic Paleudut, Ultisol), derivado de sedimentos eólicos del pleistoceno, volcánicos y cristalinos, depositados sobre el complejo metamórfico de la costa. Estos suelos se ubican en sectores altos entre los 750 y 1.100 ms.n.m. Nutritivamente se caracterizan por ser suelos deficitarios en los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, y presentan altos niveles de aluminio (CIREN, 1999a). Se caracteriza por ser un suelo profundo, de drenaje moderado y textura arcillosa de coloración pardo rojizo a pardo oscuro, excepto el horizonte superficial, el cual presenta una matriz oscura por mayor presencia de materia orgánica (6 – 10%),

consistencia ligeramente plástica y adhesiva a mayor profundidad, con un pH fuerte a moderadamente ácido en todo el perfil (Salazar y Valenzuela, 1977; CIREN, 1999b). El Predio Quitaluto presenta suelos de origen metamórfico pertenecientes a la serie La Pelada miembro de la familia franca métrica delgada de los Oxic Dystrudeps (Inceptisol). Se caracterizan por ser suelos delgados, de escasa profundidad arraigable con drenaje restringido y alta densidad aparente ( $0,88-1,18 \text{ g/cm}^3$ ).

### 3.2 Método

#### 3.2.1 Aislamientos

A partir del material colectado se extrajo con aguja enmangada inóculo desde los picnidios. Del material que no presentaba picnidios notorios, se llevó una porción de estos tejidos a cámara húmeda para la generación de inóculo. Los aislamientos se realizaron en sustrato de Agar-Malta al 2%, en placas Petri, los que fueron incubados en estufa a una temperatura de  $24^{\circ} \text{C}$  por seis días. Se utilizó un total de veinte placas Petri, diez por cada procedencia. En cada placa se realizó cuatro siembras obteniendo un total de cuarenta cepas por procedencia las que fueron identificadas numéricamente, quedando representado en los aislamientos cada punto de colecta (predios) de ambas zonas de estudio. La elección de las cepas utilizadas para el estudio fue aleatoria dentro de cada punto de muestreo. Por razones tanto de capacidad material como de disponibilidad humana fueron elegidas solo diez cepas, cinco por cada procedencia. Como en ambas procedencias hubo predios en que se contó con mayor cantidad de material, de éstos se seleccionaron dos cepas (predio Quidico en Arauco y Los Pinos en Valdivia) (cuadro 1). Posteriormente las cepas elegidas fueron reaisladas en placas individuales para ser utilizadas en los ensayos siguientes del estudio (ensayos fisiológicos, de patogenicidad y morfológicos). En el caso particular del ensayo fisiológico, el utilizar reaislamientos permitió la generación de micelio vegetativo activo, de esta manera el envejecimiento de micelio no significó una variable de influencia en el crecimiento de las colonias.

Cuadro 1. Identificación de las cepas de estudio para cada procedencia

Procedencia	Predios	Cepas
ARAUCO	Yane	CA1
	Quidico	CA2
	Quidico	CA3
	Paillacahue	CA4
	Llico	CA5
VALDIVIA	Los Pinos	CV1
	Los Pinos	CV2
	Las Palmas	CV3
	Quitaluto	CV4
	Los Ulmos	CV5

### 3.2.2 Diseño del ensayo fisiológico

La evaluación consistió en medir el crecimiento diametral de las colonias *in vitro* en placas Petri de 9 cm de diámetro. Para la observación de posibles diferencias morfológicas entre las cepas, se probaron tres medios de cultivo nutricionalmente diferentes, estos fueron: Agar Malta (AM), Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar Agua (AA). El diseño experimental consideró los tres medios de cultivo para cada cepa elegida, con cinco repeticiones por cada medio de cultivo (figura 2).

De cada cepa seleccionada se extrajo con un sacabocados una porción de aproximadamente 5 mm de diámetro, el cual se ubicó en el centro de cada placa Petri. La temperatura utilizada para el crecimiento de las colonias fue de 24°C. En las placas se midió el crecimiento diametral de las colonias en dos direcciones perpendiculares entre sí cada 24 horas. (Sobarzo, 1983). Para los análisis de los datos se utilizó el promedio de los dos diámetros de cada colonia, también con estos datos se confeccionaron curvas de crecimiento acumulado para cada procedencia creciendo en los tres medios de cultivo utilizados.

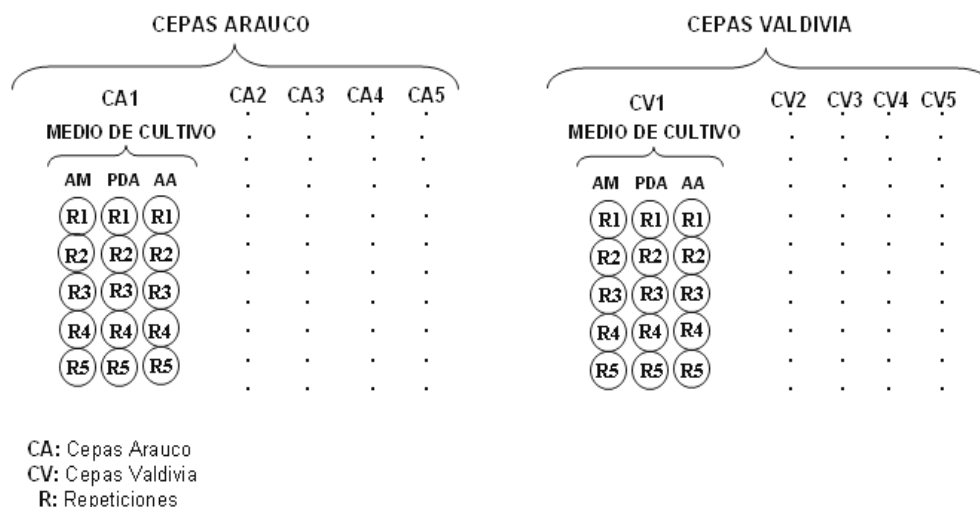


Figura 2. Esquema de diseño del ensayo fisiológico.

Para el análisis estadístico del ensayo y comparación entre procedencias, la variable utilizada fue el crecimiento diametral (mm) total de las colonias en los tres medios de cultivo, que correspondió a la cuarta medición en el ensayo.

Se utilizó un diseño factorial de dos factores (3x5): medios de cultivo y cepas. El modelo estadístico estuvo dado por la siguiente expresión (Sokal y Rohlf, 1994):

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

$y_{ijk}$  = Es la variable dependiente: diámetro de la medición (mm).

$\mu$  = Es el efecto medio del ensayo.

$\tau_i$  = Es el efecto del *i*-ésimo nivel del factor A (medio de cultivo).

$\beta_j$  = Es el efecto del *j*-ésimo nivel del factor B (cepa).

$\tau\beta_{ij}$  = Es la interacción del efecto del *i*-ésimo nivel del factor A (medio de cultivo) por el *j*-ésimo nivel factor B (cepa).

$e_{ijk}$  = Es el error.

El análisis descriptivo se presenta en gráficos con sus respectivos valores mínimos, medios, máximos y desviación estándar del crecimiento diametral de las cepas del ensayo. El análisis inferencial se realizó mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y se aplicó una prueba de multicomparación de medias (prueba de Duncan). Para comparar los promedios de diámetro de crecimiento de las colonias (para cada medio de cultivo) en ambas procedencias se utilizó la prueba “t” de Student (Sokal y Rohlf, 1994). Se comprobaron los supuestos de normalidad para cada tratamiento (prueba de Shapiro-Wilks) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) al 95% de confianza. Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS 5.0 y MICROSOFT EXCEL para el análisis estadístico de los datos.

### 3.2.3 Diseño del ensayo de patogenicidad

Se realizó un ensayo de patogenicidad (Sobarzo, 1983) constituido de tres tratamientos, uno por cada procedencia de *S. sapinea* más un testigo. Los tratamientos correspondientes a las dos procedencias fueron conformado por cinco cepas cada uno, y para cada cepa se utilizaron diez plantas (repeticiones), inoculando un total de cien plantas (figura 3). Para el ensayo se utilizaron plantas de *P. radiata* de dos meses de edad obtenidas de polinización controlada (FV10 x FV32). Las plantas median aproximadamente 25 cm de altura y 8 mm de diámetro de cuello. Al tener la seguridad de que se trata de un mismo hospedante genéticamente, la variación patogénica fue dada fundamentalmente por características del hongo.

La inoculación se realizó mediante una incisión cercana a la zona apical de las plantas, levantando una porción cortical de 3x3 mm de dimensión aproximadamente, simulando una ventanilla, donde se introdujo el inóculo (micelio) proveniente de las cepas seleccionadas. La herida se cubrió con un trocito de papel absorbente humedecido que se envolvió con Parafilm formando una pequeña cámara húmeda. Este mismo procedimiento se realizó en la mitad de las plantas testigos, solo que no se les aplicó inóculo, la otra mitad de los testigos se dejaron sin ninguna alteración; la finalidad de este procedimiento fue para percibir si existía influencia o no por la incisión en las plantas.



Una vez inoculadas las plantas, se les dió condiciones de laboratorio, con temperatura y humedad relativa de 24°C y 80% respectivamente, condiciones controladas periódicamente, y generadas en una sala de cultivos, donde las plantas se introdujeron en cámaras de polietileno, de esta manera el riego cada 48 horas y la transpiración de las plantas mantenía la humedad requerida. Se midió el avance del hongo en las plantas cada siete días durante tres semanas (Sobarzo, 1983).

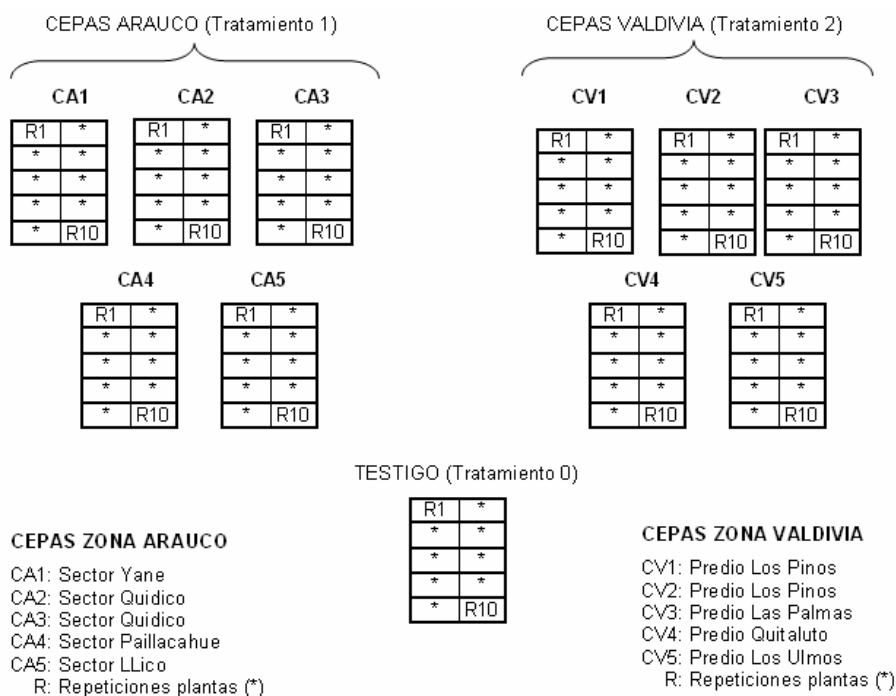


Figura 3. Esquema de diseño del ensayo de patogenicidad.

Para el análisis estadístico y comparación entre procedencias, la variable utilizada fue el avance del hongo en la planta medido en milímetros. Se utilizó un diseño completo al azar separadamente para cada procedencia. El modelo estadístico estuvo dado por la siguiente expresión (Sokal y Rohlf, 1994).

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

donde:

- $y_{ij}$  = Es la variable dependiente: avance (mm).
- $\mu$  = Es el efecto medio del ensayo.
- $\tau_i$  = Es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (cepas).
- $e_{ij}$  = Es el error.

Para los análisis descriptivos e inferenciales se utilizó los métodos aplicados para los ensayos fisiológicos.

#### *3.2.4 Análisis morfológicos*

El estudio morfológico se orientó a observaciones y mediciones microscópicas de esporas (Osorio y Sobarzo, 1986). Se midió un total de 20 esporas por cada cepa en ambas procedencias.

Para la obtención de esporas se utilizaron picnidios contenidos en los tejidos de las plantas del ensayo de patogenicidad. Para evitar errores en la medición, se homogeneizaron las esporas a medir, colocando tejidos con presencia de picnidios en cámara húmeda. De esta manera se indujo la esporulación, por lo que solo fueron medidas esporas maduras.

Para los análisis estadísticos descriptivos e inferenciales para la comparación entre procedencias, las variables analizadas fueron el largo y ancho de las esporas medidas en micrones. El diseño y los métodos estadísticos aplicados, fueron los mismos utilizados para el ensayo de patogenicidad.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamientos

En el tejido utilizado para los aislamientos se observó la presencia de picnidios (figura 4A) de color negro, inmersos en los tejidos.

El desarrollo del hongo en AM se observó un micelio aéreo abundante de color blanquecino al comienzo de su desarrollo, tornándose de color gris oscuro a medida que transcurrían los días, en este caso a los seis días de realizados los aislamientos (figura 4B). Estas características fueron también descritas por Sobarzo (1983), Palmer *et al.* (1987) y Madinabeitia (2004). Según Swart y Wingfield (1991) estos aspectos morfológicos corresponderían al morfotipo A, siendo el más extendido en el mundo.

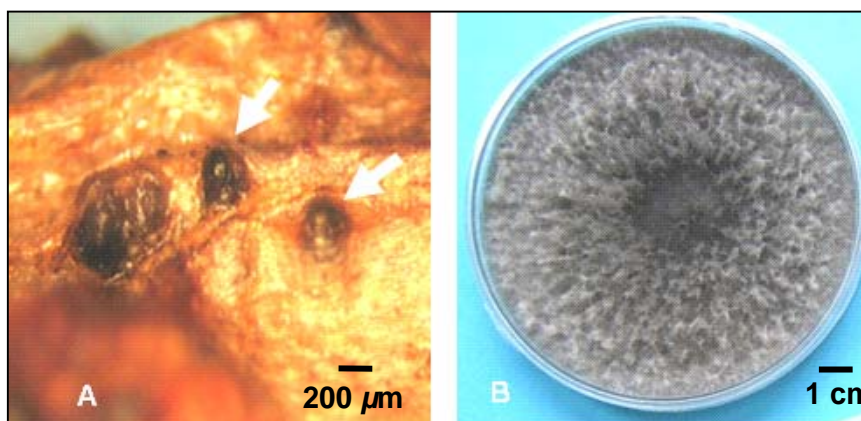


Figura 4. Inóculo y aislamientos de *S. sapinea*. A) presencia de picnidios en material colectado; B) aislamiento del hongo en sustrato de Agar Malta al 2%.

### 4.2 Análisis de ensayos fisiológicos

La morfología de las cepas fue diferente en los tres medios de cultivo utilizados (figura 5). El hongo en AM desarrolló un micelio aéreo abundante de color blanquecino al comienzo de su desarrollo, el que se tornaba de color gris oscuro a medida que transcurrían los días (figura 5A). Sobarzo (1983) y Chou (1976a) describieron similares características de desarrollo de *S. sapinea* utilizando el mismo medio de cultivo en ensayos fisiológicos.

En APD el desarrollo y morfología del micelio, durante los dos primeros días de iniciado el crecimiento, fue similar que en AM formando un micelio blanquecino y abundante, como lo describen Palmer *et al.* (1987) y Madinabeitia (2004) quienes utilizaron el mismo medio de cultivo (figura 5B). Estos autores agregan que el micelio, a medida se que iba desarrollando, terminaba adquiriendo una coloración gris oscura. Esta característica difiere de la observada en este ensayo, porque el micelio se tornó de color gris oscuro, terminó adquiriendo un color negro, y además

presentó irregularidad de los bordes de las colonias (característica no mencionada en ese estudio) a igual período de desarrollo que el utilizado por estos autores. Esta diferencia observada podría estar influida por la concentración de los componentes del medio de cultivo, ya que los autores antes señalados no mencionan la concentración de los componentes utilizados (Agar y Dextrosa). Webster y Hewitt (1969), en estudios de caracteres morfológicos de *Diplodia spp.*, concluyen que variaciones en las concentraciones de los componentes del sustrato o la aplicación de vitaminas, las cepas expresan diferencias morfológicas de micelio y en sus colonias.

En AA se formó un micelio ralo y de tonalidades grisáceas pálidas. También se observó que las colonias formaron bordes fuertemente irregulares de aspecto fibroso. Esta característica pudo ser causada por la falta de nutrimento del sustrato lo que influyó claramente en la morfología de las colonias (figura 5C).

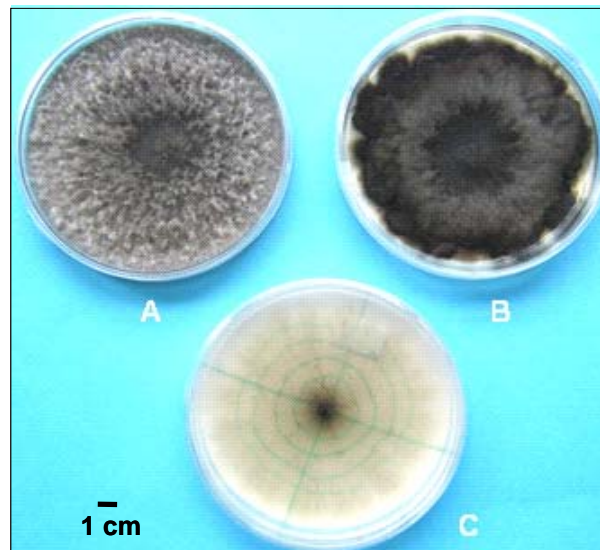


Figura 5. Crecimiento de una misma cepa de *S. sapinea* en medios de cultivo diferentes, A) Agar Malta; B) Agar Papa Dextrosa; C) Agar Agua.

El crecimiento diametral acumulado de las cepas en los tres medios de cultivo presentó una tendencia similar a la de un crecimiento indefinido, basándose en la categoría propuesta por French (1980) (figura 6). En Chile Sobarzo (1983) y Osorio (1977) obtuvieron igual tendencia en AM de crecimientos diamétricos acumulados del hongo en ensayos realizados con distintas procedencias de *S. sapinea*, en igual período de tiempo y temperatura.

Las cepas en AM y APD, tuvieron similar ritmo de crecimiento en los tres primeros días del ensayo, y al cuarto día las cepas en AM superó en crecimiento a los restantes medios utilizados ( $p < 0,05$ ). El crecimiento de las cepas en AA fueron significativamente menores en diámetro con respecto a los otros dos medios de cultivo ( $p < 0,05$ ) (figura 6 y 7).

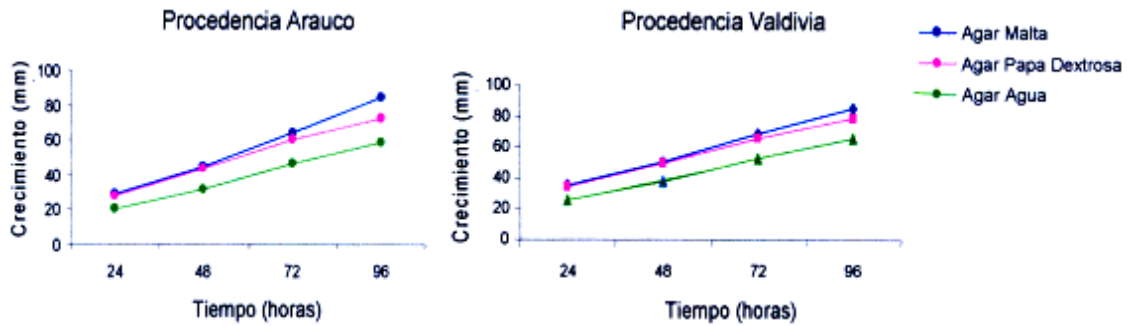


Figura 6. Crecimiento diametral acumulado de las cepas de *S. sapinea* de ambas procedencias en los tres medios de cultivo ensayados.

En AM las cepas presentaron mayor desarrollo, y obtuvo un promedio de diámetro de  $84 \pm 0,2$  mm. El mayor crecimiento del hongo en este medio de cultivo, pudo estar influido por el componente de Malta que contiene el sustrato, satisfaciendo mejor las demandas nutritivas del hongo para su crecimiento. Utilizando el mismo medio de cultivo y a igual temperatura Sobarzo (1983) y Cedeño *et al.* (2001) obtuvieron similares rangos de crecimiento diametral en ensayos fisiológicos con cepas de *S. sapinea*. Al realizar comparaciones del crecimiento de las cepas de *S. sapinea* de ambas procedencias en cada medio de cultivo (figura 7), se obtuvo que no existían diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de las cepas creciendo en un mismo medio de cultivo, es decir las dos procedencias de *S. sapinea* presentaron iguales ritmos de crecimiento en los tres medios de cultivo, siendo coincidentes con los resultados obtenidos por Osorio y Sobarzo (1986) quienes no encontraron diferencias significativas entre los crecimientos de las cepas obtenidas desde la V a la X Región en Chile.

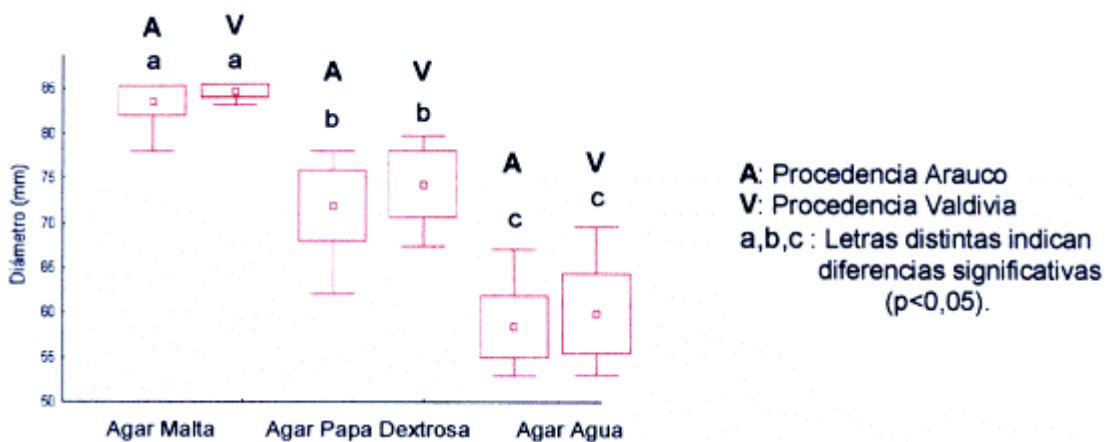


Figura 7. Crecimiento diametral promedio y comparación estadística de las colonias de *S. sapinea* de ambas procedencias (al cuarto día) en los tres medios de cultivo ensayados (n=25).

En estudios de ensayos fisiológicos, Palmer *et al.* (1987) señalan que *S. sapinea* en sustrato de APD crece en promedio  $81,2 \pm 0,7$  mm a igual temperatura y tiempo de incubación utilizados en el presente ensayo. Ese promedio difiere del obtenido en este ensayo, lo que se podría explicar por la concentración de los componentes del sustrato utilizados por estos autores, ya que no mencionan las concentraciones empleadas y podrían diferir de las utilizadas en este ensayo. En la literatura no se registran ensayos que hayan utilizado AA como sustrato para este hongo, lo más probable es por tratarse de un sustrato pobre, pero podría ser un medio de cultivo interesante de probar si se trata de buscar diferencias morfológicas en hongos, ya que en sustratos empobrecidos los hongos tienden a formar incluso estructuras reproductivas Webster y Hewitt (1969).

#### 4.3 Evaluación de la patogenicidad

A diferencia de las plantas testigos (figura 8A) la sintomatología observada de las plantas inoculadas comenzó con una clorosis progresiva de acículas, y el tejido comenzó a mostrar una depresión desde la zona de inoculación, característica concordante por la descrita por Brookhouser y Peterson (1970), Chou (1976), Osorio (1977), Sobarzo (1983) y Cedeño *et al.* (2001). Al cabo de tres semanas el hongo causó la muerte de las plantas (figura 8). Los primeros síntomas comenzaron a manifestarse a partir del quinto día de realizada la inoculación (figura 8B). Se observó el avance del hongo a través de la planta, manifestándose una tonalidad café claro bajo la corteza. Posteriormente los tejidos invadidos por el hongo se necrosaron, y sobre éstos comenzaron a aparecer fructificaciones de color negro, correspondientes a picnidios (figura 8C), primero sobre la zona de inoculación y luego en el tallo y acículas, en comparación con los dos tipos de testigos que se mantuvieron verdes sin ningún problema.

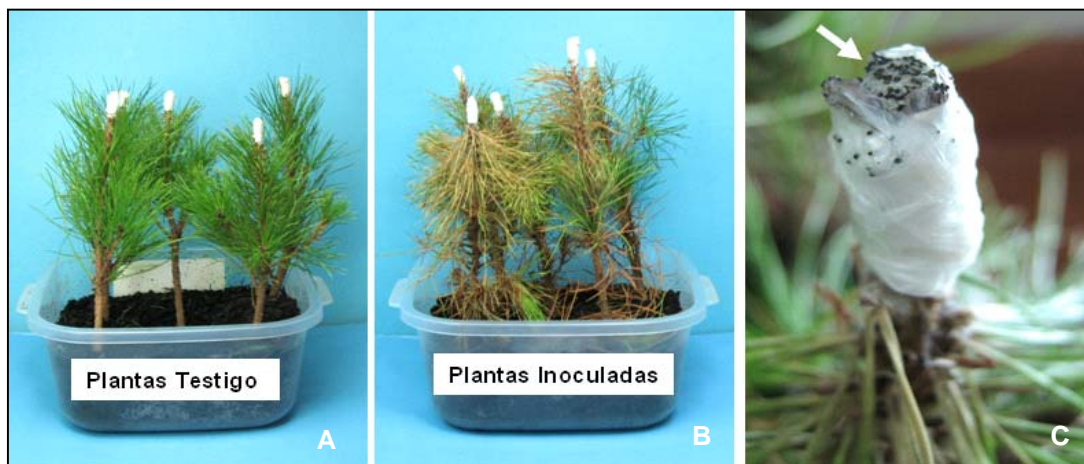


Figura 8. Ensayo de patogenicidad de *S. sapinea*. A) plantas testigo solo con incisión; B) clorosis progresiva; C) presencia de picnidios en la zona de inoculación de la planta.

En los análisis se obtuvo que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para el avance de las cepas de ambas procedencias (figura 9), es decir todas las cepas



tienen igual avance en las plantas inoculadas finalizado el ensayo a los 21 días (anexo 2). El avance promedio de las cepas de Arauco fue de  $162\pm 14$  mm y las cepas de Valdivia fue de  $171\pm 12$  mm. Sobarzo (1983) en ensayos de patogenicidad, realizó inoculaciones en plantas de dos años de edad, y obtuvo similares resultados a los obtenidos en este estudio utilizando plantas de mayores dimensiones. Brookhouser y Peterson (1970) y Chou (1976a) señalan que en plantas de *P. radiata* de seis meses de edad inoculadas con este hongo, causó la muerte de ellas en tres semanas, siendo coincidente con el resultado obtenido en este ensayo. Se podría decir que *S. sapinea* es un patógeno violento, ya que causa la muerte de plantas pequeñas en muy tiempo, de lo que se podría deducir que las procedencias nacionales este hongo tienen igual grado de patogenicidad que cepas extranjeras.

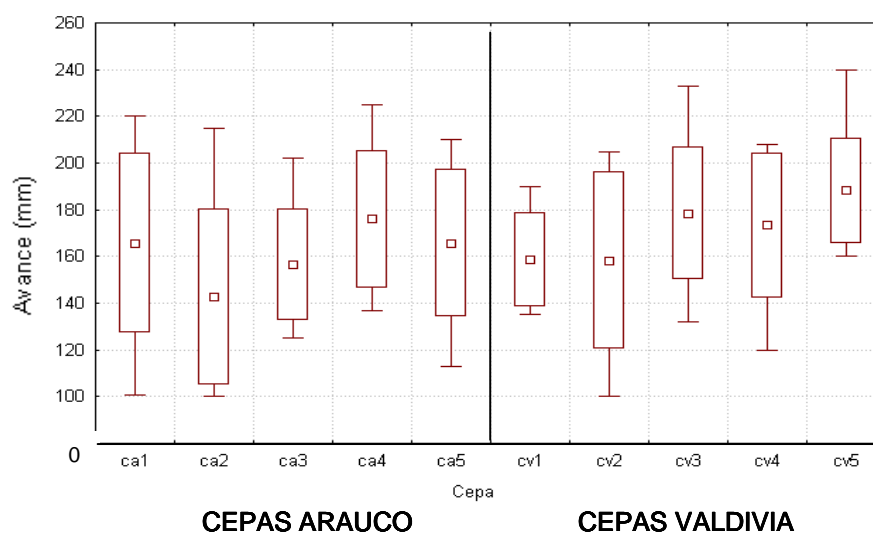


Figura 9. Avance promedio de cada cepa de *S. sapinea* de ambas procedencias (n=10).

Aunque las plantas utilizadas eran genéticamente iguales, se puede observar que una misma cepa no tuvo el mismo avance en las diez plantas inoculadas. Por ejemplo para la cepa CA1 en la figura 9, se observa que la variación fluctuó desde los 100 mm hasta los 220 mm, doblándose el avance del hongo en algunas plantas. Aunque no existen registros en la literatura que señalen esta variación, durante las mediciones realizadas, se observó que en las plantas que presentaron verticilos, a diferencia de las que no lo presentaban, el avance del hongo se vio disminuido o frenado, y en algunos casos prácticamente no se registró más avance en las mediciones realizadas. Esta particularidad se podría asociar con los daños producidos en plantaciones de *P. radiata*, como lo descrito por Chou (1976a) y Gutiérrez y Osorio (1981), quienes señalan que *S. sapinea* causa como daño principal malformaciones y multiflechas, de lo que se puede inferir que algunos árboles muestran recuperación frente al ataque del hongo en los puntos de formación de los verticilos generándose las malformaciones descritas. Las posibles causas de esta recuperación podrían estar ligadas a la genética de los árboles manifestando

resistencia frente al patógeno o a la fisiología del árbol, como lo observado en este ensayo.

#### 4.4 Análisis morfológico

Las esporas se obtuvieron de los picnidios formados sobre la zona de inoculación, de las plantas utilizadas en el ensayo de patogenicidad (figura 10A y 10B). Se pudo observar que las cepas de *S. sapinea* de ambas procedencias, presentaron esporas que en su estado más avanzado de su desarrollo, de pigmentación parda y de formas ovoides, clavadas y uniseptadas (figura 10D). Las esporas de ambas procedencias oscilaron entre 31 y 45  $\mu\text{m}$  de largo por 13 a 19  $\mu\text{m}$  de ancho, y se encuentran dentro de los rangos señalados por Chou (1976b), Osorio (1977), Sutton (1980) y Swart y Wingfield (1991). Las esporas en su estado inmaduro eran de tonalidades hialinas a amarillentas y carecían del tabique central (figura 10C).

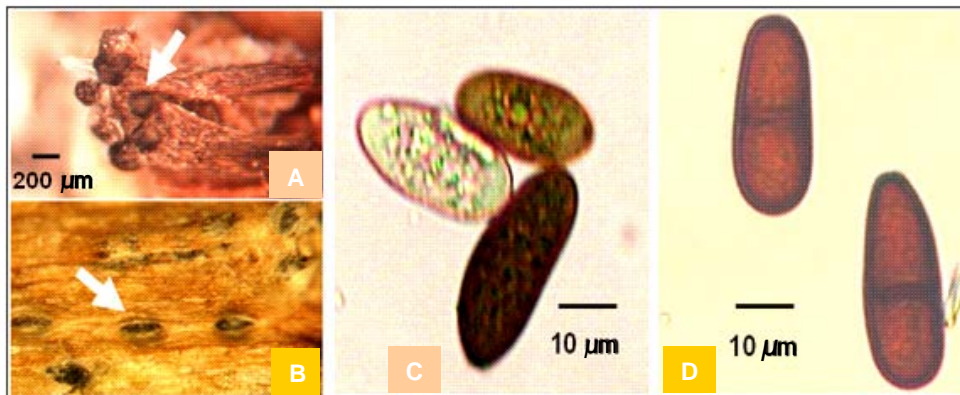


Figura 10. Estructuras morfológicas de *S. sapinea*. A y B) picnidios inmersos en tejido de plantas inoculadas; C) esporas en diferentes estados de maduración; D) esporas maduras tabicadas.

Las esporas de las cepas de Arauco presentaron en conjunto mayor largo que las esporas de las cepas de Valdivia, y en particular la cepa CA3 presentó el mayor largo de esporas del grupo (figura 11). Se pudo observar que en esporas de cepas de una misma procedencia también se registraron diferencias respecto del largo. Estadísticamente se obtuvo que existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los promedios del largo de las esporas de las diez cepas, estableciéndose tres grupos. Aunque se registraron grupos, tanto en ensayos fisiológicos como en los de patogenicidad, no se observaron diferencias que llevaran a sospechar de cepas con mayor o menor virulencia en plantas inoculadas.



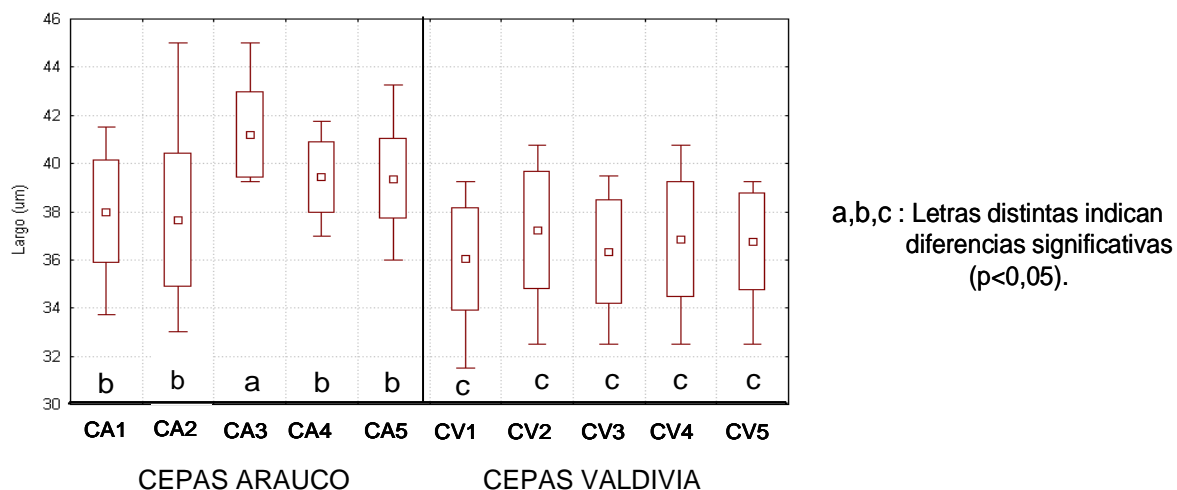


Figura 11. Largo promedio de las esporas de *S. sapinea* de ambas procedencias (n=20)

Osorio y Sobarzo (1986), en ensayos morfológicos obtuvieron similares resultados en las mediciones de esporas, encontrando diferencias significativas tanto en el largo y ancho de éstas, pero no registraron diferencias en la patogenicidad al realizar inoculaciones en plantas. Chou (1976b), en 18 aislamientos realizados de material infectado con *S. sapinea* colectado en diferentes zonas de Nueva Zelanda, encontró diferencias significativas en el tamaño de las esporas, pero no detectó diferencias en la patogenicidad de las cepas. Igual resultado obtuvieron Palmer *et al.* (1987) en aislamientos de cepas de *S. sapinea* en Estados Unidos respecto del tamaño de esporas y de la patogenicidad de *S. sapinea*. En ese estudio encontraron dos grupos de esporas que diferían en el largo y ancho, y las diferencias las ratificaron con observaciones en microscopio electrónico de barrido, donde observaron que las paredes de las esporas se diferenciaban por la rugosidad que presentaban. Estos autores también realizaron análisis moleculares, y concluyeron que en Estados Unidos se encontrarían dos morfotipos, A y B los que fueron reportados posteriormente por Swart y Wingfield (1991) en Sudáfrica. En el presente estudio solo se analizó el tamaño de espора, por lo que sería necesario a futuro realizar estudios donde se involucren observaciones como las descritas por estos autores.

Al igual que en el largo de espора, en el análisis de varianza para el ancho, se obtuvo que existen diferencias significativas para esta variable (p<0,05) entre las cepas. A través de la prueba de de Duncan se establecieron tres grupos entre las cepas (figura 12). En esta figura se puede observar que dentro de una misma procedencia puede haber diferencias del ancho de esporas.

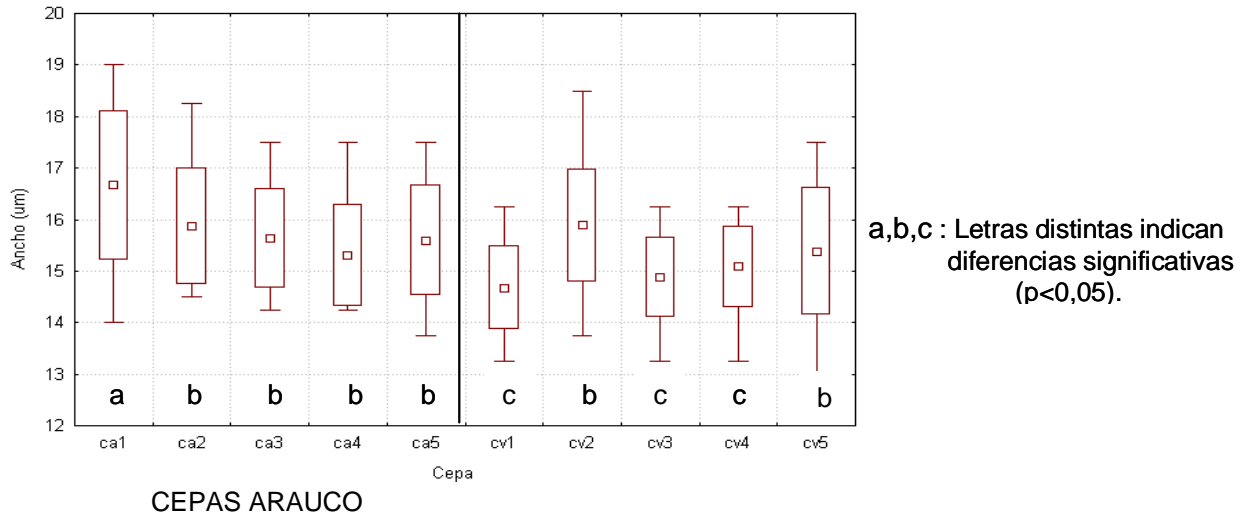


Figura 12. Ancho promedio de las esporas de *S. sapinea* de ambas procedencias (n=20)

La tendencia de la forma de las esporas de *S. sapinea* en las procedencias de estudio, fue del tipo oval clavada (figura 13A). Sólo la cepa CA3 (procedente de Arauco) difirió en tamaño, forma y pigmentación (figura 13B). En la literatura se pueden encontrar referencias a los dos tipos de esporas de *S. sapinea* encontrados en este ensayo. Swart y Wingfield, (1991) y Cedeño *et al.* (2001), señalan que en la literatura las descripciones de *S. sapinea* presentan confusión respecto a los rangos de tamaño y forma de las esporas, argumento que ratificaría los resultados obtenidos en el presente estudio referentes a las variaciones encontradas.



Figura 13. Tipos de esporas encontrados. A) esporas tipo oval clavada; B) esporas tipo oval cilíndrica

El tamaño de esporas (largo y ancho) de *S. sapinea* fue significativamente mayor (p < 0,05), en las cepas de la procedencia Arauco que en las de Valdivia (figura 14).

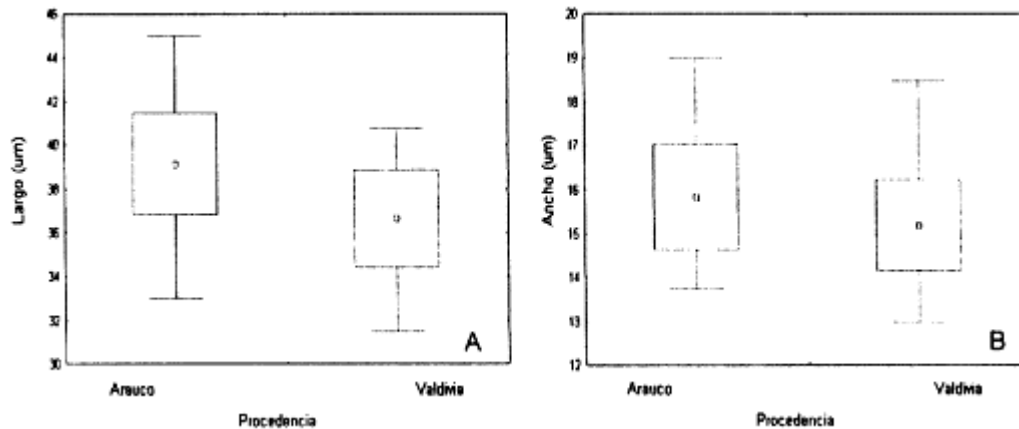


Figura 14. Comparación de tamaño de esporas de *S. sapinea* de cada procedencia de estudio: A) largo de espóra ; B) ancho de espóra

Al integrar los resultados obtenidos en los ensayos realizados en este estudio (fisiológicos, patogenicidad y morfológicos), se obtuvo que no existieron diferencias significativas en el desarrollo *in vitro*, ni tampoco de patogenicidad de las procedencias estudiadas. Aunque ambos lugares de procedencias son distintos en el macroclima, el hongo está presente y desarrollándose normalmente en las dos zonas. Lo que difiere es el comportamiento patogénico de *S. sapinea* en ambas zonas, en el caso de la zona de Arauco el hongo se presenta con patogenicidad activa, y en la zona de Valdivia la patogenicidad se encontraría en estado latente o a la espera de condiciones de predisposición para su activación. Prueba de ello sería en el sector alto de Quitaluto en la zona de Valdivia, donde se observa mortalidad de árboles de *P. radiata*. En esta zona las condiciones de sitio restrictivas estarían dadas principalmente por las características de los suelos delgados, con alto grado de erosión y pluviometría, aspectos que contribuirían a la baja de vigor de los árboles y favorecerían la patogenicidad del hongo. Osorio (1977), Chou (1976a) y Cedeño *et al.* (2001), señalan que las condiciones de sitio restrictivas son favorables para el desarrollo de epifitias causadas por el hongo, mencionando suelos deficitarios de nutrientes, suelos erosionados y secos. En los predios Los Pinos, Las Palmas y Los Ulmos, en la zona de Valdivia el hongo solo se encontraría asociado a material de desecho como saprófito, infiriendo que las características de sitio en estos predios no serían condiciones de predisposición para la patogenicidad del hongo.

En la zona de Arauco, donde *S. sapinea* actualmente está causando serios ataques en plantaciones de *P. radiata* de diferentes edades, al parecer la causa también involucraría a condiciones de sitio. En este sentido, González y Jonquera (1997) señalan que condiciones de predisposición para el hongo en la VIII Región, influirían principalmente los períodos prolongados de sequías. Sería necesario contar con antecedentes climáticos históricos y recientes para establecer la relación de esta variable versus ocurrencias de epifitias provocadas por el hongo. A diferencia de la zona de Valdivia, en primavera y verano la zona de Arauco registra períodos secos de aproximadamente cuatro a cinco meses (Fuenzalida, 1971). Esta condición podría

ser la principal causante de la predisposición de la patogenicidad del hongo. García y Diez (2003) asocian a *S. sapinea* como un hongo activo en climas calurosos denominándolo como un hongo termófilo.

La variabilidad del tamaño de las esporas de las cepas de dos procedencias podría ser una característica propia del hongo. Esto se podría explicar por los rangos señalados por varios autores en que se percibe variabilidad, aunque algunos de ellos mencionan que la confusión se deba quizás a errores de mediciones o a las metodologías aplicadas para la obtención de esporas, como lo menciona Cedeño *et al.* (2001).

Como en el presente estudio hubo diferencias en el tamaño de las esporas de *S. sapinea* de cepas de dos zonas geográficas diferentes, se podría inferir que las condiciones climáticas diferentes, podría tener influencia sobre el tamaño de las esporas, es decir podría existir una adaptabilidad de las esporas a estas situaciones geográficas afectando la variabilidad de tamaño. Chou (1976b) en estudios de comparación de cepas de distintas zonas geográficas de Nueva Zelanda, obtuvo diferencias de tamaños de esporas, pero este autor no menciona ni hace relación a la posible influencia climática de cada zona referente a esta característica.

En base a los análisis y resultados obtenidos en el presente estudio se hace necesario considerar en futuras investigaciones las siguientes proyecciones:

- Realizar estudios morfológicos de las paredes de las esporas del hongo mediante microscopía electrónica de barrido (Swart y Wingfield, 1991) con el fin de establecer que morfotipo/s podrían estar presentes en Chile.
- Mediante técnicas moleculares (Blodgett y Bonello, 2003) establecer comparaciones entre aislamientos de *S. sapinea* encontradas en Chile.
- Propuestas de métodos para la generación de esporas de *S. sapinea* de tamaños uniformes, con el fin corregir la confusión existente en la información relacionada con la morfología y dimensiones de esporas (Cedeño *et al.* 2001).
- Realizar ensayos de patogenicidad en plantas de vivero de *P. radiata* con y sin presencia de verticilos para evaluar la posible influencia fisiológica de esta característica.

## 5. CONCLUSIONES

- Las cepas de *S. sapinea* de las procedencias de Arauco y Valdivia presentaron igual comportamiento respecto a la fisiología y patogenicidad.
- Las esporas de Arauco presentaron mayor tamaño (largo y ancho) respecto a las esporas de Valdivia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. Tercera edición. Editorial Limusa, México. 838 p.
- Barnett, H., B. Hunter. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4<sup>a</sup> edition. Minneapolis, EE.UU. 241p.
- Blodgett, J.; G. Stanosz. 1999. Differences in Agressiveness of *Sphaeropsis sapinea* RAPD Marked Group Isolates on Several Coníferas. Plant Disease. 83(2): 853-856.
- Brookhouser, L.; W. Peterson. 1970. Infection of Austrain, Scots, and Ponderosa Pines by *Diplodia pinea*. Phytophatology 61(6): 409-414.
- Blodgett, J.; P. Bonello. 2003. The aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* on Austrian pine varies with isolate group and site of infection. Forest Pathology 33(4): 15-19.
- Butín, H.; H. Peredo. 1986. Hongos parásitos coníferas de América del Sur con especial referencia en Chile. Biblioteca Micológica. Editorial Cramer, Berlín. 100p.
- Cedeño, L.; C. Carrero; W. Franco; A. Torres. 2001. *Sphaeropsis sapinea* asociado con la quema del cogollo, muerte regresiva, y cáncer en troncos, ramas y raíces del Pino Caribe en Venezuela. Interciencia 26(5):210-215.
- CIREN, 1999a. Estudio Agrológico de la VIII Región. Centro de Información de Recursos Naturales, Santiago, Chile. Tomos I y II. 58 p.
- CIREN, 1999b. Estudio Agrológico de la X Región. Centro de Información de Recursos Naturales, Santiago, Chile. 60 p.
- Chou, C.K.S. 1976 a. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. I. Symptoms, disease development and isolation of the pathogen. New Zealand Journal of Forestry Science 6(1): 72-79.
- Chou, C.K.S. 1976 b. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. II. Inoculation studies. New Zealand Journal of Forestry Science 6(3): 409-420.
- Chou, C.K.S. 1977. Suppression of *Diplodia pinea* spore germination at the shoot surface of *Pinus radiata*. New Zeland Forest Service 11(1): 3-7.
- Chou, C.K.S. 1981. Effect of tree age on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* Plant Disease 61(3): 101-104.

- Chou, C.K.S.; McKenzie, M. 1988. Effect of pruning intensity and season on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* stem through pruning wounds. *European Journal of Forest Pathology* 18(7): 437-444.
- Dick, M. 1999. *Sphaeropsis sapinea* Diseases of Pines. A Review from a New Zealand Perspective. *New Zealand Forest Health Research* 89(5) 30-43.
- Donoso, C. 1993. Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica. Editorial Universitaria, Tercera Edición. 483p.
- French, E.; H. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 289p.
- Fuenzalida, H. 1971. Climatología de Chile. Santiago (Chile), Departamento de Geofísica y Geodesia, Universidad de Chile. 66p.
- García, B.; J. Diez. 2003. Uso del Método de Rodales Y Sistemático para evaluar daños por *Sphaeropsis sapinea* en *Pinus radiata* afectado por granizo en Bizkaia, España. *Bioagro* 15 (1) 25-31.
- González, G.; P. Jorquera. 1997. Muerte Apical, Marchitamiento de la Copa y Otras Enfermedades del Pino Radiata Asociadas a *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko y Sutton. Nota Técnica. CONAF, N° 33.
- Gutiérrez, J.; M. Osorio. 1981. Evaluación física y económica del daño producido por *Diplodia pinea* en un rodal de pino insigne de 14 años de edad. Departamento de Desarrollo Silvícola, Forestal Minínco S.A. Concepción Chile. 25 p.
- Huber, A. 1970. Diez años de observaciones climatológicas en la estación Teja – Valdivia (Chile) 1960 – 1969. Fac. de Cs. Naturales y Matemáticas, Instituto de Geología y Geografía, Universidad Austral de Chile. 61 p.
- Martínez, R. 2004. Mapa de reconocimiento de suelos de la VIII Región del Bío-Bío (Sector Sur). Tesis Ing.For. Santiago, Universidad de Chile, Fac. de Cs. Agronómicas. 152 p.
- Madinabeitia T., 2004. Relación entre la poda y la presencia de *Sphaeropsis sapinea* en *Pinus radiata* en la provincia de Gipuzkoa. Tesis Ing. Mon. Lleida, Universidad de Lleida, Fac. de Cs. Agraria, España. 120p.
- Marks, G.; G. Minko. 1968. The pathogenicity of *Diplodia pinea* to *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Botany*. 17(5): 1-12.
- Nicholls, T.; M. Ostry. 1990. *Sphaeropsis sapinea* Canker on Stressed red and jack pines in Minnesota and Wisconsin. *Plant Disease*. 74(4): 54-56.

- Osorio, M. 1977. Epifitias en Plantaciones Chilenas de Pino Insigne (*Pinus radiata* D. Don) Causada por *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx. Actas de las VIII Jornadas y Primer Congreso Argentino de Micología. Cordova, 4 al 8 de Octubre. pp 431-439.
- Osorio, M; G. Sobarzo. 1986. Tipificación y control *in vitro* de *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx. Prospección Nacional Sanitaria Forestal CONAF/UACH. Informe de Convenio N° 106, 36 p.
- Palmer, M.; Stewart, E.; Wingfield, M. 1987. Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. *Phytopathology* 77(3): 44-48.
- Peterson, W. 1981. Diplodia Blight of Pines. *Phytopathology* 67 (1): 511-514.
- Punithalingam, E.; J. Waterson. 1970. *Diplodia pinea*. Pathogenic fungi and bacterial. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. N° 2, 8p.
- Salazar, J.; R. Valenzuela. 1977. Elaboración de un mapa de suelos para un predio forestal. Tesis Ing. For. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Forestales. 89 p.
- Sokal, R.; Rohlf, F. 1994. Biometry. State University of New York. Ed.W.H. Freeman and Company. 520p.
- Sutton, B. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfiti with Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 696 p.
- Schlegel, F.; O. Martínez. 1987. Flórmula de los predios Los Pinos y Las Palmas, Cayumapu, Valdivia. *Bosque (Chile)* 8 (1): 31-47.
- Sobarzo, G. 1983. Contribución a la evaluación biológica del daño producido por *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx. En plantaciones de *Pinus radiata* D. Don. Tesis Ing.For. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Forestales. 140p.
- Swart, W.; Winfield, M. 1991. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on pinus species in South Africa. *Plant Disease* 16 (2) 761-766.
- Waterman, A. 1943. *Diplodia pinea* and *Sphaeropsis malorum* on soft pines. *Phytopathology* 12 (3) 828-831.
- Webster, R.; W., Hewitt. W.B. 1969. Studies on *Diplodia* and *Diplodia*-like Fungi: VI. Effect of Natural Substrates on Variability in Taxonomic Characters. *Hilgardia* 42 (5): 107-121.



## SUMMARY

In the present study were evaluated strain of the *Sphaeropsis sapinea* fungus originating of the zone of Arauco and Valdivia. The aim to compare both origins was because in the zone of Arauco severe fungus is associated to damage in plantations of *Pinus radiata*, whereas in the zone of Valdivia fungus would rather have a saprofitic form on remainders in the forest. In order to establish the comparison between origins material with presence of the fungus was collected, and five strain by origin were used. The evaluation was through physiological tests, proving the growth of the strain in three nutritional different culture substrates: Malta Agar, Potato Dextrosa Agar and Water Agar.

Pathogenicity tests were made proving the virulence of the strain on plants of *Pinus radiata* of two months of age, those that were inoculated with the fungus in the apical zone of these. The variable to measure was the advance of the fungus in the plant, and the data were analyzed by means of descriptive and inferencial statistic.

Also morphologic comparisons took place making measurements of wide length and of spores. The results of the physiological tests in proven means of culture did not register significant differences in the averages of growth in the strain of both origins. The pathogenicity test lasted of three weeks, time in the fungus took in giving death to the plants and significant differences as far as the aggressiveness were not registered, that is to say, the used strain of *S. sapinea* presented equal degree of virulence. Significant differences in the measured variables of the spores were registered, but the ranks of measurement of these variables are within the described ones by Literature. Although differences of size in the spores were registered, in the physiological tests and of pathogenicity differences were not detected that take to suspect strain with greater or smaller degree of virulence.

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Análisis estadístico de los ensayos fisiológicos.

### 1.1 Análisis de varianza para el diámetro de las colonias (mm).

Fuente de variación	Grados libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	P valor
Medio cultivo	2	15.828,4	7.914,2	1.467,41	0.000**
Cepa Medio cultivo	9	521,1	57,9	10,73	0.000**
X Cepa	18	515,2	286,2	5,31	0.000**
Error	120	647,2	539,3		
Total corregido	149	17.511,9			

\*\* : Altamente significativo al 99% de confianza  $p < 0,01$

### 1.2 Prueba "t" de medias para el diámetro de las colonias (mm), según procedencia.

Procedencia		Prueba "t"	P valor
Arauco	Valdivia		
71,2	72,9	-0,96	0,341 ns

ns: no significativo al 95% de confianza  $p > 0.05$

1.3 Ranking de interacciones de las cepas de *S. sapinea* en los tres medios de cultivo para ambas procedencias (prueba Duncan).

Lugar (cepas)	Medio cultivo X Cepa	Diámetro promedio (mm)	Grupos *
1	AM X cv3	85,0	a
2	AM X ca1	84,8	a
3	AM X cv4	84,8	a
4	AM X ca5	84,6	a
5	AM X cv2	84,6	a
6	AM X cv5	84,6	a
7	AM X ca4	84,0	ab
8	AM X cv1	83,6	ab
9	AM X ca2	83,2	ab
10	AM X ca3	81,2	b
1	APD X cv5	77,6	c
2	APD X cv1	76,4	cd
3	APD X cv4	75,2	cde
4	APD X ca5	74,8	cde
5	APD X ca1	74,6	cde
6	APD X ca4	73,6	de
7	APD X cv2	72,4	e
8	APD X cv3	72,0	e
9	APD X ca2	68,4	f
10	APD X ca3	67,6	f
1	AA X cv5	66,2	f
2	AA X ca4	62,4	g
3	AA X cv4	60,4	gh
4	AA X ca2	59,2	hi
5	AA X cv3	59,0	hi
6	AA X ca3	57,6	hij
7	AA X cv2	57,0	ij
8	AA X ca1	56,6	ij
9	AA X ca5	56,0	ij
10	AA X cv1	55,2	j

\* Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## Anexo 2. Análisis estadístico del ensayo de patogenicidad

### 2.1 Análisis de varianza para el avance (mm).

Fuente de variación	Grados libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	P Valor
Tratamiento (cepas)	9	15.466,0	1.718,4	1,82	0,075 ns
Error	90	84.913,0	943.478,0		
Total Corregido	99	100.379,0			

ns: no significativo al 95% de confianza  $p > 0,05$

### 2.2 Prueba "t" de medias para el avance (mm), según procedencia.

Procedencia		Prueba "t"	P valor
Arauco	Valdivia		
161,33	171,30	-1,60	0,114 ns

ns: no significativo al 95% de confianza  $p > 0,05$

### 2.3 Ranking de Cepas para el Avance (mm).

Lugar	Cepa	NºObs	Avance medio (mm)
1	cv5	10	188
2	cv3	10	178
3	ca4	10	176
4	cv4	10	173
5	ca1	10	166
6	ca5	10	166
7	cv1	10	159
8	cv2	10	158
9	ca3	10	156
10	ca2	10	143

### Anexo 3. Análisis estadístico de las variables largo y ancho de esporas.

#### 3.1 Análisis de varianza para el largo de espora (um).

Fuente de variación	Grados libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	P Valor
Tratamiento (cepas)	9	467,2	51,9	11,43	0,000 **
Error	190	863,4	4,5		
Total Corregido	199	1.330,6			

\*\* : Altamente significativo al 95% de confianza  $p < 0,05$

#### 3.2 Análisis de varianza para el ancho de espora (um).

Fuente de variación	Grados libertad	Suma cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	P Valor
Tratamiento (cepas)	9	61,2	6,8	5,79	0,000 **
Error	190	222,9	1,2		
Total Corregido	199	284,1			

\*\* : Altamente significativo al 95% de confianza  $p < 0,05$ .