



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

Caracterización de los estados anamorfos de *Neonectria fuckeliana* asociado a malformaciones en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don

Patrocinante: Sr. Rodrigo Morales R.

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

EDUARDO JAVIER MOLINA RADEMACHER

VALDIVIA
2010

CALIFICACIÓN DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

		Nota
Patrocinante:	Sr. Rodrigo Morales R.	59
Informante:	Sr. Eduardo Valenzuela F.	66
Informante:	Sra. Isabel Vives G.	58

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. Rodrigo Morales R.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores Eduardo Valenzuela e Isabel Vives por sus aportes y comentarios en este Trabajo de Titulación, y en especial al profesor patrocinante Rodrigo Morales ya que sin su descubrimiento este Trabajo de Titulación no se podría haber llevado a cabo.

Por ultimo mis sinceros agradecimientos a todas las personas que ayudaron a que se pueda realizar 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	3
2.4 Condiciones que favorecen la epítia	4
3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	5
3.1 Material	5
3.1.1 Origen del material	5
3.1.2 Características edafoclimáticas de la zona de colecta de muestras	5
3.2 Método	5
3.2.1 Técnicas de aislamiento	5
3.2.2 Diseño del ensayo fisiológico	6
3.2.3 <i>Análisis morfológicos de estructuras</i>	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1 Aislamientos	7
4.2 Análisis del ensayo fisiológico	7
4.3 Análisis morfológicos	8
4.3.1 Características de <i>Acremonium-like</i>	8
4.3.2 Características de <i>Cylindrocarpon cylindroides</i>	10
5. Conclusiones	12
6. BIBLIOGRAFÍA	13
ANEXOS	
1 <i>Abstract and Key words</i>	
2 Análisis estadístico	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estados anamorfos de <i>Neonectria spp.</i> A) <i>Acremonium-like</i> perteneciente a <i>N. fuckeliana</i> . B) <i>Cylindrocarpon lucidum</i> perteneciente a <i>N. lucida</i>	3
Figura 2. Tipos de colonias de <i>N. fuckeliana</i> obtenias en Agar-Malta al 2%	7

Figura 3.	Crecimiento diametral acumulado de las 10 cepas de <i>N. fuckeliana</i>	8
Figura 4.	Estructuras morfológicas de <i>Acremonium-like</i> . A: fiálides (a) y conidias (b). B: gliosporas (c)	8
Figura 5.	Largo (A) y ancho (B) promedio de conidias de <i>Acremonium-like</i>	9
Figura 6.	Largo (A) y ancho (B) promedio de fiálides de <i>Acremonium-like</i>	10

RESUMEN EJECUTIVO

En el presente estudio se evaluaron cepas del patógeno *Neonectria fuckeliana*, con el objetivo de caracterizar sus estados anamorfos. Las cepas se aislaron de material de *Pinus radiata* procedentes de la comuna de Toltén, Chile. Se trabajó con diez cepas aisladas en laboratorio y se evaluaron a través de ensayos fisiológicos (medición de crecimiento diametral de las colonias) y morfología de éstas (medición de estructuras), las variables a comparar entre las cepas fueron el largo y ancho de conidias y fiálides.

En los aislamientos se obtuvo el estado *Acremonium-like*, registrándose diferencias significativas entre sus cepas. Para obtener el estado *Cylindrocarpon cylindroides* se instaló ramillas de *P. radiata* en el medio de cultivo. Después de cuatro semanas se evaluó el ensayo, donde no se presentó el estado *C. cylindroides*. Se puede concluir que el estado *Acremonium-like* se encuentra presente en el estudio y que el estado *C. cylindroides* no se obtuvo con la metodología empleada.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies forestales de importancia económica en Chile, *Pinus radiata* D. Don representa el primer lugar con una superficie aproximada de 1,5 millones de hectáreas plantadas, por lo que se debe mantener a esta especie libre de plagas y enfermedades, debido a que estas pueden tener un impacto en la descalificación de los productos madereros hasta en el cierre de los mercados internacionales, pudiendo provocar una serie de problemas en la economía del país.

En el año 2008 se reportó en Chile un nuevo patógeno de carácter fungoso asociado a *P. radiata* llamado *Neonectria fuckeliana* (C. Booth) Castl. & Rossman el cual causa canchros y malformaciones fustales, la enfermedad ha sido llamada comúnmente como “revirado”, en localidades donde se ha presentado esta sintomatología. El conocer las características morfológicas y sus estados anamorfos contribuirá para la biología de este patógeno en Chile, lo que será de utilidad para futuros ensayos de patogenicidad. En consideración a lo anterior, se han fijado los siguientes objetivos:

- Caracterizar los estados anamorfos de *N. fuckeliana*.
- Determinar diferencias morfológicas entre cepas de *N. fuckeliana* colectadas en Toltén.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes generales

Neonectria fuckeliana (C. Booth) Castl. & Rossman comb. nov. anteriormente denominada *Nectria fuckeliana* Boot (Castlebury *et al.*, 2006; Dick y Crane, 2009), es un hongo originario del hemisferio Norte, lugar en que se desarrolla como patógeno débil en *Abies concolor*, donde ataca árboles caídos y debilitados (Dick *et al.*, 2006) .

En su lugar de origen *N. fuckeliana* actúa como saprófito común en las ramas muertas de coníferas. Entre sus hospedantes se encuentran especies de los géneros *Abies*, *Picea*, *Larix* y *Pinus* (Peace, 1962).

No hay registro de que *N. fuckeliana* ataque a *P. radiata* en forma natural en su lugar de origen, a diferencia de Nueva Zelanda donde se registra como patógeno para esta especie (Dick *et al.*, 2006).

El primer reporte de este hongo se realizó en el año 1937 en la isla de Anticosti en Québec, Canadá (Schultz y Parmeter, 1990). En Chile fue reportado por Morales en el año 2008 en una plantación de *P. radiata* en la comuna de Toltén, Región de la Araucanía, Chile, donde las malformaciones fustales han sido vistas durante los últimos 5 años¹ (Morales, 2009).

2.2 Taxonomía del Hongo

Neonectria fuckeliana en su estado sexual pertenece a la división Ascomycota, Orden Hypocreales. Su principal característica es que presenta fructificaciones de color rojo a marrón llamadas peritecios, los cuales crecen agrupados sobre los canchales y la corteza muerta (Morales, 2009).

Los peritecios poseen forma esférica y una abertura apical llamada ostiolo, y su diámetro es de 300 a 400 μm . En el interior de éstos se encuentran los ascos, midiendo entre 86-120 μm de largo por 7-9 μm de ancho, los que contienen ocho ascosporas en su interior, las que miden entre 12-16 μm de largo por 5-6 μm de ancho, estas son de forma fusiforme a elipsoide, de color hialino a café suave en la madurez (Funk, 1981; Brayford *et al.*, 2004).

Neonectria fuckeliana presenta dos estados asexuales (Figura1). El principal de ellos corresponde a *Cylindrocarpon cylindroides* var. *tenuis*, y en condiciones de laboratorio usando medios de cultivo se obtiene una fase asexual intermedia que corresponde a *Acremonium-like* (Dick *et al.*, 2006).

¹ Ricardo Urra, 2008, administrador fundo Miramar, Comunicación Personal.

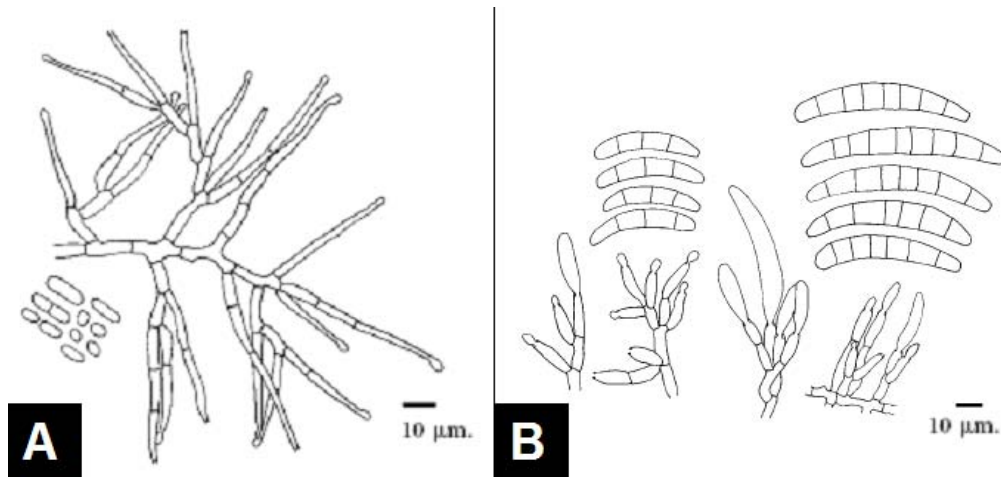


Figura 1. Estados anamorfos de *Neonectria* spp. A) *Acremonium*-like perteneciente a *N. fuckeliana*. B) *Cylindrocarpon lucidum* perteneciente a *N. lucida*. Fuente: Brayford *et al.*, 2004.

El estado *Acremonium*-like se caracteriza por presentar micelio aéreo y escaso, de crecimiento lento, alcanzando de 15 a 30 mm de diámetro en sus colonias en diez días en un medio de cultivo de Agar-Papa-Sacarosa (PSA). El micelio es hialino o pigmentado de color blanco, gris rosado o naranja cambiando a blanco en los márgenes. Éste está compuesto por conidióforos, fiálides y conidios, los que se caracterizan por ser unicelulares y excepcionalmente bicelulares ligeramente curvos, mientras que las fiálides tienen forma de punzón septadas en la base y crecen libres o en verticilos (Domsch *et al.*, 1980; Brayford *et al.*, 2004). Éstas miden en su mayoría entre 30 a 70 μm de largo y 1,5 a 3,5 μm de ancho, mientras que las conidias miden entre 3 a 7 μm de largo y de 2 a 4 μm de ancho, no se observa presencia de clamidosporas ni de macroconidias (Brayford *et al.*, 2004).

El estado *C. cylindroides* se caracteriza por presentar abundantes macroconidias de forma cilíndrica, rectas o ligeramente curvadas con extremos redondeados. Las conidias pueden variar de 1 a 7 septos pero son más comunes entre 3 a 5 septos, sus dimensiones van de 30 a 80 μm de largo por 4,5 a 6,5 μm de ancho, no se observa presencia de clamidosporas (Brayford *et al.*, 2004).

Según Booth y Roll-Hansen (citado por Brayford *et al.*, 2004), muchos de los aislamientos no producen macroconidias o la capacidad de producir macroconidias se puede perder después de algún tiempo en los cultivos. Brayford *et al.*, (2004) sugiere que al no estar en presencia de macroconidias lleva a pensar que la relación entre *N. fuckeliana* y *Cylindrocarpon* no es correcta.

2.3 Sintomatología

En Nueva Zelanda la enfermedad comienza con resinación en los muñones de árboles podados, seguida por pequeñas zonas hundidas en el fuste, las cuales pueden extenderse hasta el nivel del suelo necrosando completamente el fuste y ramas. La infección en el fuste continúa para dejar acanaladuras verticales de

tejido necrótico en el árbol. Las deformaciones pueden perdurar por años hasta el final de la rotación comercial y el follaje de los árboles no presenta sintomatología aunque estén muy atacados. Este hongo puede atacar plantaciones de *P. radiata* que sufran heridas o que sean podadas, ingresando a sus hospedantes a través de estas lesiones (Peace, 1962; ENSIS, 2006).

2.4 Condiciones que favorecen la epítia

Entre los factores que favorecen la infección está el tamaño de la lesión causada por la poda (diámetro de muñón), la profundidad de la herida, la altura de la lesión, el tiempo que tarda en cicatrizar la herida. De igual forma la poda de invierno conlleva un aumento en la infección en Nueva Zelanda. Se puede disminuir la infección al modificar el calendario de podas. El hongo se desarrolla a una temperatura entre los 5 a 28° C en laboratorio, su óptimo es entre 18 y 25° C (ENSIS, 2006). Las heridas en los fustes pueden ser por efectos de una poda o por un factor abiótico como las heladas (Peace, 1962).

3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Material

3.1.1 Origen del material

El material de estudio correspondió a trozas con canchros presentes en rodales de *P. radiata* con presencia de signos de *N. fuckeliana*, procedente del predio Miramar ubicado en las cercanías de la comuna de Toltén, Región de la Araucanía, Chile (39° 16'43" S y 73° 09'59" O).

El material provino de dos rodales de 6 y 7 años de edad respectivamente, los cuales presentaban 80% de ataque aproximadamente. Se trabajó con muestras provenientes de cinco árboles por cada rodal (diez muestras en total), que presentaban canchros con presencia de cuerpos fructíferos. Estas fueron trozas de entre 40 y 50 cm de largo extraídas a una altura en la que había presencia de lesiones (canchros) que va de entre dos a tres metros, las que fueron llevadas a laboratorio.

3.1.2 Características edafoclimáticas de la zona de colecta de muestras

La zona de Toltén se caracteriza por tener una topografía con lomajes y cerros con suelos profundos a moderadamente profundos, los cuales son derivados de esquistos metamórficos y sedimentos marinos, zona de crecimiento 0-7-3 (Schlatter *et al.*, 1995). El clima es de tipo templado lluvioso con influencia marina el cual se caracteriza por presentar precipitaciones de 1.994 mm anuales, mientras que las temperaturas máxima y mínima promedio son 21° y 5° C respectivamente, la humedad relativa promedio es de 83% anual (Santibañez y Uribe, 1993).

3.2 Método

3.2.1 Técnicas de aislamiento

Para aislar el patógeno se procedió de acuerdo con el protocolo modificado de aislamiento de hongos foliares², por lo que se extrajo peritecios a partir del material colectado. Para el cultivo se seleccionó peritecios de color rojo oscuro a través de mediciones (fructificaciones maduras), estos debieron medir entre 300 y 400 μm de diámetro (Brayford *et al.*, 2004).

El protocolo consistió en sumergir un conjunto de fructificaciones por treinta segundos en una solución de alcohol al 70%, luego se sumergió en una solución de cloro comercial en relación 1:1, para después ser sumergidos nuevamente en una solución de alcohol al 70% por treinta segundos. Finalmente se sumergió en agua destilada estéril por un minuto.

² Prof. Jeffrey Stone, 2009, Oregon University, Comunicación Personal.

De cada muestra fustal, se extrajo veinte peritecios, los que se sembraron en Agar-Malta al 2% (Dick *et al.*, 2006). En las placas se aplicó una solución de antibiótico de 0,5 ml de penicilina y estreptomina en el medio de cultivo, para evitar el desarrollo de bacterias en los aislamientos. Las placas se almacenaron en una estufa de cultivo a 23°C por una semana, para luego escoger a través de números aleatorios y dentro de las que presenten el color y la textura que se menciona en la revisión bibliográfica una colonia por cada muestra fustal. Ésta se resembró en un punto por placa en tres placas con cinco repeticiones cada una, la primera de éstas se destinó a ensayos fisiológicos, la segunda a la caracterización del estado *Acremonium-like*, y la tercera a la obtención del estado *C. cylindroides*, para lo cual se instaló una ramilla de *P. radiata* la cual fue previamente esterilizada en autoclave³.

3.2.2 Diseño del ensayo fisiológico

De cada cepa seleccionada se extrajo de su margen con un sacabocados de 0,5 mm de diámetro una porción de colonia, la cual se ubicó en el centro de cada placa Petri con el fin de resembrar las colonias. Luego se llevó a estufa de cultivo a 23° C.

La evaluación consistió en medir el crecimiento en diámetro de las colonias, lo cual se hizo con un pie de metro y en dos direcciones perpendiculares cada cuatro días con un total de cinco mediciones, con el fin de observar posibles diferencias entre las cepas y construir una curva de crecimiento (French y Hebert, 1980). Para confeccionar esta curva se utilizaron los promedios de los diámetros de cada medición.

La textura de la colonia se evaluó de acuerdo a su morfología micelial desarrollada en cultivo (Newman *et al.*, 2008). Mientras que el color se evaluó a través de una tabla Munsell. Las evaluaciones se llevaron a cabo al día veinte de su desarrollo.

3.2.3 Análisis morfológicos de estructuras

Para caracterizar y comparar las estructuras entre cepas, se llevo a cabo mediciones microscópicas de largo y ancho de 50 conidias y 50 fiálides por cada cepa. Las mediciones se hicieron en un microscopio con escala de graduación. Para el análisis estadístico del ensayo y la comparación entre cepas las variables utilizadas fueron el largo y ancho de esporas y fiálides. El análisis estadístico de los datos se hizo a través de un Análisis de Varianza para determinar si existen diferencias significativas dentro de los grupos y una prueba de multicomparación de medias (Tukey) con un 95% de confianza para analizar entre los grupos. El análisis del estado *C. cylindroides* se hizo cuatro semanas después de instaladas las ramillas de *P. radiata*.

³ Margaret Dick, 2009, New Zeland Forest Research, Comunicación Personal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamientos

De los doscientos peritecios aislados el 18 % no sufrió contaminación alguna por parte de otros hongos, por lo que el protocolo de desinfección resultó ser adecuado para el patógeno (Figura 2). Se obtuvo la fase *Acremonium-like*, resultando tres tipos de colonias, unas de color blanco, otras de color rosado anaranjado y otras de color intermedio entre blanco y rosado anaranjado cambiando a blanco en los bordes. En medios de cultivo de Agar-Malta se observó un micelio rastrero, de crecimiento lento con micelio aéreo, compuesto por conidióforos y fiálides. Estas características también fueron descritas por Domsch *et al.* (1980) y Brayford *et al.* (2004).

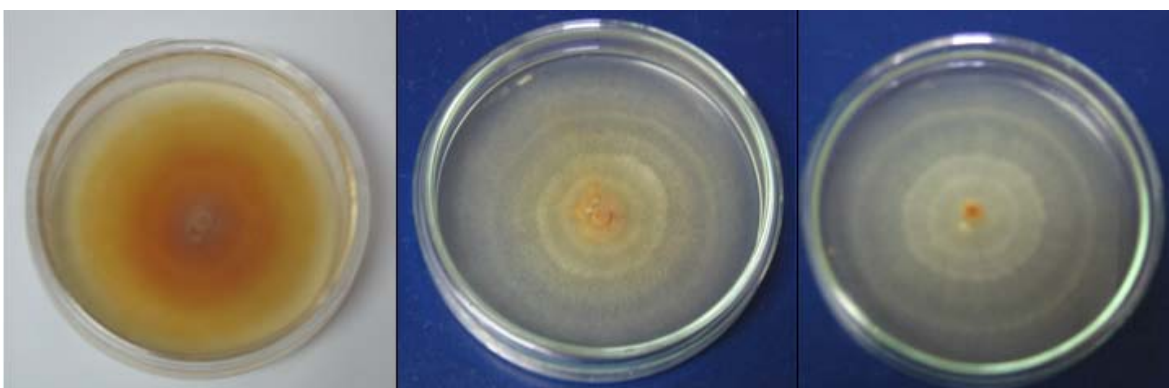


Figura 2. Tipos de colonias de *N. fuckeliana* obtenidas en Agar-Malta al 2%.

4.2 Análisis del ensayo fisiológico

En medio de cultivo se desarrolló un micelio aéreo, ralo, viscoso, de bordes blancos e irregulares, de color blanco al inicio de su desarrollo (Figura 2), de las cuales el 27 % mantuvieron ese color, el 17 % de éstas se tornaron de color naranja (2,5YR4/6 dark red) con el transcurso de los días, mientras que el 56 % restante se tornó de un color intermedio entre blanco y naranja (5YR7/6 yellow). Brayford *et al.* (2004) encontraron iguales características en el desarrollo de *N. fuckeliana* en el mismo medio de cultivo.

La morfología macroscópica de las colonias varió con el color de éstas, presentando de acuerdo a Newman *et al.* (2008) una colonia estrellada, para los cultivos blancos y de color intermedio, la cual se caracterizó por tener sus radios de crecimiento bastante marcados, mientras que los cultivos color rosado anaranjado se caracterizaron por presentar una colonia colapsada.

El crecimiento diametral acumulado de las cepas fue bastante lento, concordando con lo mencionado por Domsch *et al.* (1980) y Brayford *et al.* (2004), tardando 19 días en crecer $71 \pm 0,3$ mm, presentando un ritmo promedio de crecimiento diametral diario de 3,8 mm, el cual fue mayor que el observado por Brayford *et al.*

(2004) lo cual se puede deber al medio de cultivo PDA o a la temperatura utilizada 20° C, ya que a menor temperatura se espera un menor ritmo de crecimiento. En las colonias se presentó una tendencia similar a la de un crecimiento indefinido, según la categoría propuesta por French y Hebert (1980) (Figura 3).

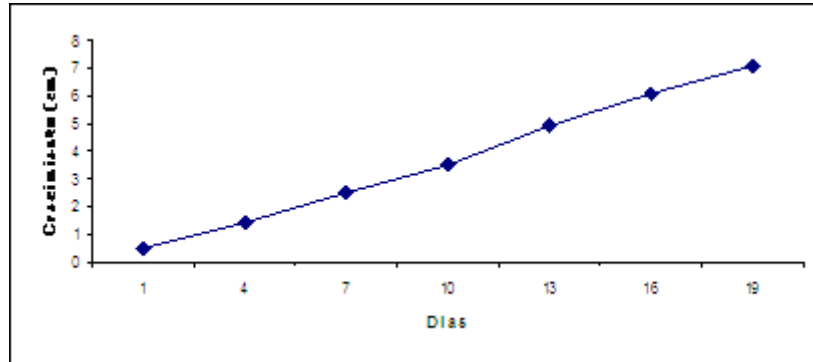


Figura 3. Crecimiento diametral acumulado de las 10 cepas de *N. fuckeliana*.

4.3 Análisis morfológico

4.3.1 Características de *Acremonium-like*

Las conidias obtenidas en el medio de cultivo (AM 2%) se observó que presentaron forma fusiforme, de color hialino, unicelulares y también se encontró conidias bicelulares, las unicelulares se desarrollaron en forma agrupada (gliosporas) (Figura 4 B) o esparcidas en el medio (Figura 4 A). Las conidias bicelulares se caracterizaron por presentar un color oscuro, de forma fusiforme y de borde redondeados.

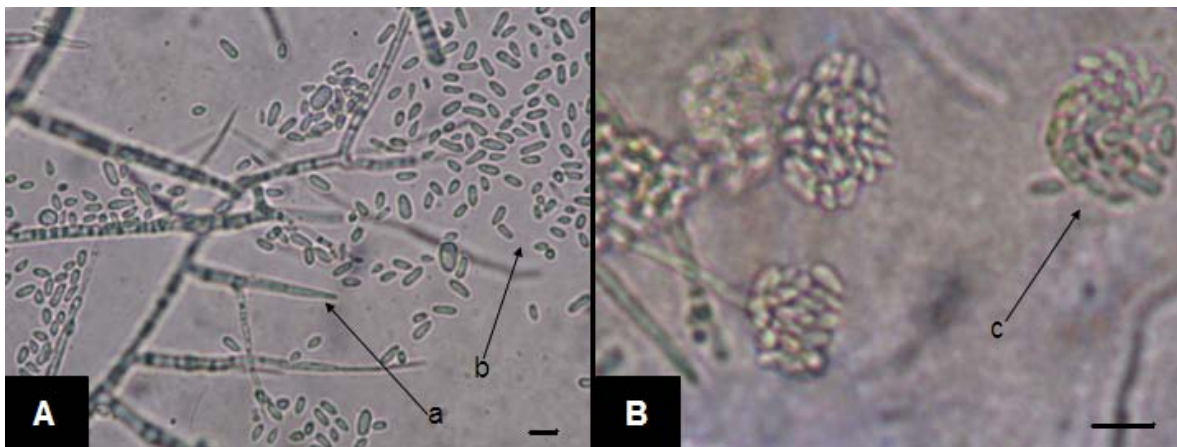


Figura 4. Estructuras morfológicas de *Acremonium-like*. A: fiálides (a) y conidias (b). B: gliosporas (c) (barra= 10 μm).

El largo de las conidias osciló entre 4,2 y 8,4 μm , el promedio de éstas fue 5,6 \pm 0,6 μm , mientras que su ancho varió entre 2,6 y 3,5 μm , presentando un ancho

promedio de $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Figura 5), concordando con lo descrito por Brayford *et al.* (2004). La cepa que registró el mayor largo de conidias fue la cepa uno, siendo la que presento el menor diámetro de colonia, mientras que las cepas ocho y nueve registraron los menores largos y el mayor diámetro de colonia junto a las cepas cuatro y cinco. En lo que se refiere al ancho promedio de éstas el mayor valor se obtuvo en la cepa número dos mientras que el menor valor se registró en la cepa nueve. El hecho de que los valores máximos y mínimos de largo y ancho de conidias no se registren en la misma cepa se debe a la forma de éstas, ya que las de menor largo presentaron una forma más esférica que el resto que posee una forma fusiforme.

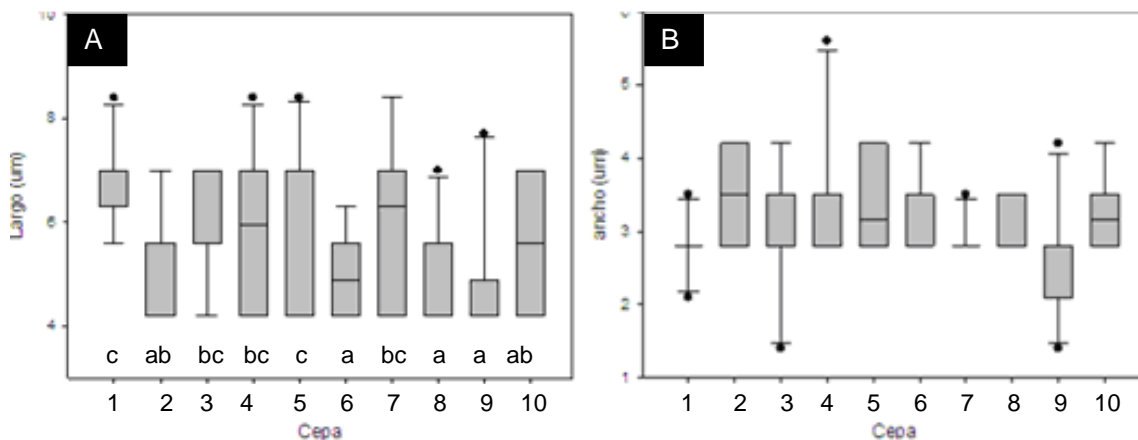


Figura 5. Largo (A) y ancho (B) promedio de conidias de *Acremonium-like*.

Según la prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov, el largo de las conidias presentó una distribución normal ($P > 0,05$) (anexo 2). Se encontró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($P < 0,05$), estableciendo así tres grupos (Figura 5). El hecho de que algunas cepas se repitan en dos grupos se debe a que estas no diferían significativamente de los dos grupos en los que se incluyen.

Las fiálides resultaron ser de color hialino, con forma de punzón, unicelulares, septadas en la base, creciendo en verticilos o sueltas (Figura 6).

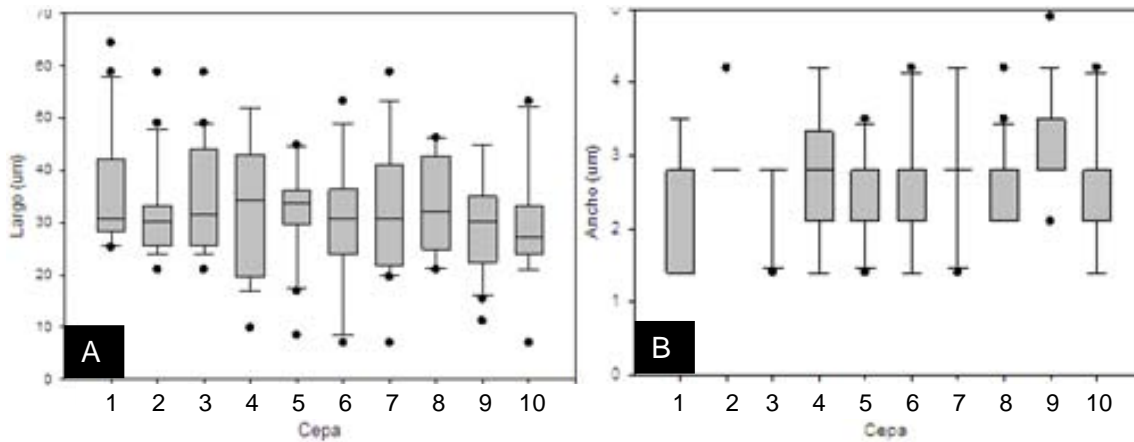


Figura 6. Largo (A) y ancho (B) promedio de fiálides de *Acremonium-like*.

El largo máximo y mínimo de las fiálides osciló entre 78,4 y 7 μm respectivamente, el promedio de éstas resultó ser $32,6 \pm 12,2 \mu\text{m}$, mientras que su ancho varió entre 1,4 y 4,9 μm , presentando un ancho promedio de $2,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (Figura 6), resultando un rango un poco mayor que el descrito por Brayford *et al.* (2004). En donde se registró el mayor largo de fiálides fue en la cepa tres, mientras que la cepa diez presentó el menor valor del largo de estas. En lo que se refiere al ancho promedio de éstas el mayor valor se obtuvo en la cepa número nueve, mientras que el menor valor lo presentaron las cepas número uno, tres, cuatro, cinco, seis, siete, y diez. Los valores máximos y mínimos de largo y ancho de las fiálides no se presentaron en la misma cepa, debido a que el ancho de éstas se midió en el centro de cada una de ellas, y éstas tienen forma de punzón, por lo que disminuyen en ancho al aumentar en largo.

Según la prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov, el largo de las fiálides sigue una distribución normal ($P > 0,05$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cepas, lo cual se puede deber al material genético de cada cepa.

4.3.2 Características de *Cylindrocarpon cylindroides*

En los aislamientos no se encontró macroconidias de *C. cylindroides*, lo que indica que no se presentó este estado anamorfo. Similar resultado encontró Brayford *et al.* (2004), lo que le llevó a pensar que la relación entre *N. fuckeliana* y *Cylindrocarpon* no es correcta (Brayford *et al.*, 2004). La ausencia de macroconidias en los cultivos se puede deber al medio de cultivo utilizado, debido a que éste le entrega los elementos nutritivos al hongo. Otra razón puede ser el tiempo de evaluación, aunque según Brayford *et al.* (2004) la capacidad de producir macroconidias se puede perder después de algún tiempo en los cultivos (Booth y Roll-Hansen, citado por Brayford *et al.*, 2004).

Para encontrar el estado *C. cylindroides* se debería dar más tiempo al estudio, dándole más tiempo al ensayo o probando más medios de cultivo, y distintas temperaturas.

5. CONCLUSIONES

- Se determinaron diferencias significativas entre las cepas (largo de fiálides y conidias) de *N. fuckeliana* aisladas desde los peritecios obtenidos desde las muestras fustales de *P. radiata* colectadas en Toltén.
- El estado *Acremonium-like* se encontró presente en el estudio.
- El estado *C. cylindroides* no se encontró en este estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Brayford, D.; B. Honda; F. Mantiri y G. Samuels. 2004. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. *Mycologia* 96(3): 572–597.
- Castlebury, L.; A. Rossman y A. Hytem. 2006. Phylogenetic relationships of *Neonectria/ Cylindrocarpon* on *Fagus* in North America. *Systematic Botany & Mycology Laboratory* 84(1): 1417-1433.
- Dick, M.; L. Bulman ; P. Crane. 2006. *Nectria fuckeliana* infection of *Pinus radiata* in New Zealand: Research approach and interim results. Proceedings of the 53rd Western International Forest Disease Work Conference; Jackson, WY, USA, 26-30 September 2005.
- Dick, M.; P. Crane. 2009. *Neonectria fuckeliana* in pathogenic to *Pinus radiata* in New Zeland. *Australasian Plant Disease Notes* 4(1): 12-14.
- Domsch, K.; W. Gams y T. Anderson 1980. Compendium of soil fungi. USA, Academic Press. v. 1, 859 p.
- ENSIS. 2006. *Nectria fuckeliana* infection of *Pinus radiata* in New Zeland. INTERNET:
<http://www.ensisjv.com/ResearchCapabilitiesAchievements/ForestHealthBioscurityandFire/ForestPestFactSheet/Nectriaflutecanker/tabid/433/Default.aspx>
(Mayo 7, 2009)
- French, E. y T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 275 p.
- Funk, A. 1981. Parasitic Microfungi of western trees. Canada, Canadian Forestry Service Pacific Forest Research Centre Victoria. 164 p.
- Newman, E. Midlej, S. Bezerra, J. De Souza, J. Fiqueredo. 2008. Glosario ilustrado de *Phytophthora*. Brasil. Centro de Pesquisa do Cacau. 91 p.
- Morales, R. 2009. Detección de *Neonectria fuckeliana* en Chile, asociado a cancos y malformaciones fustales en plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* (Chile) 30 (2): 106-110.
- Peace, TR. 1962. Pathology of trees and shrubs. USA. Oxford University Press. 570 p.
- Santibáñez, F. y J. Uribe. 1993. Atlas Agroclimático de Chile: Regiones VIII y IX. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Laboratorio de Agroclimatología. 66 p.

Schlatter JE, V. Gerding; H. Huber. 1995. Sistema de ordenamiento de la tierra: herramienta para la planificación forestal en la X Región. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ingeniería Forestal, Valdivia, Chile. 93 p.

Schultz, M. y J. Parmeter. 1990. A Canker Disease of *Abies concolor* caused by *Nectria fuckeliana*. *Plant Disease* 74(2): 178-180.

ANEXOS

Anexo 1
Abstract and Key words

Characterization of states of *Neonectria fuckeliana* anamorphs associated with malformations in *Pinus radiata* D. Don,

Abstract:

The present study characterizes and evaluated the stage development of the anamorphic stand *Neonectria fuckeliana*. The strain were isolated from *Pinus radiata* material, this material from the region of Toltén, Chile. This work with ten was performed were isolated in the laboratory and through physiological tests (measuring diameter growth of the colonies and morphology of these (measuring structures), the variables to compare between the was strain were the length and width of conidia and phialides.

In the isolates was obtained *Acremonium*-like stage, showing significant differences between strains. To can take out the stand *Cylindrocarpon* settled *cylindroides* twigs of *P. radiata* in the culture medium. After four weeks the test was evaluated, where the stage failed to show *C. cylindroides*. In conclude that the *Acremonium*-like stage is present in the study and that the stage *C. cylindroides* was not obtained by the methodology employed.

Key words: *Acremonium-like*, *Cylindrocarpon cylindroides*, *Pinus radiata*, *Neonectria fuckeliana*, pathogen, Chile.

Anexo 2
Análisis estadístico

Cuadro 1. Test de normalidad para el largo de conidias.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			V2
N			1500
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		5,656
	Std. Deviation		1,3172
Most Extreme Differences	Absolute		,236
	Positive		,236
	Negative		-,166
Kolmogorov-Smirnov Z			5,266
Asymp. Sig. (2-tailed)			,086

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Cuadro 2. Análisis de varianza del largo de conidias.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	163,562	9	18,174	12,682	,000
Within Groups	702,170	490	1,433		
Total	865,732	499			

Cuadro 3. Grupos de diferencias significativas largo de conidias (Prueba Tuckey).

V1	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
8	150	4,900		
9	150	4,900		
6	150	5,040		
2	150	5,320	5,320	
10	150	5,600	5,600	
3	150		5,880	5,880
4	150		5,950	5,950
7	150		6,020	6,020
5	150			6,370
1	150			6,580

Sig.		,102	,102	,102
------	--	------	------	------

Cuadro 4. Test de normalidad para el largo de fiálides.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			largo
N			1500
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		32,606
	Std. Deviation		11,4641
Most Extreme Differences	Absolute		,142
	Positive		,142
	Negative		-,086
Kolmogorov-Smirnov Z			2,846
Asymp. Sig. (2-tailed)			,067

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Cuadro 5. Análisis de varianza del largo de fiálides.

	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	806,562	18,174	12,762	,000
Within Groups	1472,160	2,373		
Total	2278,722			