



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales

Evaluación de la patogenicidad de *Neonectria fuckeliana* en plantas de vivero de *Pinus radiata*

Patrocinante: Sr. Rodrigo Morales R.

Trabajo de Titulación presentado como parte de los
requisitos para optar al Título de
Ingeniero Forestal

CRISTIAN DANIEL GONZÁLEZ SÁNCHEZ
VALDIVIA
2011

Índice de materias		Página
i	Calificación del Comité de Titulación	i
ii	Agradecimientos	ii
iii	Dedicatoria	iii
iv	Resumen	iv
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ESTADO DEL ARTE	2
2.1	Descripción general del patógeno	2
2.2	Taxonomía de <i>N. fuckeliana</i>	2
2.3	Sintomatología y daños	3
2.4	Patogenicidad de <i>N. fuckeliana</i>	4
3	MÉTODOS	5
3.1	Preparación de inóculo y características de las plantas del ensayo	5
3.2	Métodos de inoculación	6
3.3	Diseño y metodología de evaluación del ensayo de patogenicidad	9
4	RESULTADOS	11
4.1	Desarrollo de <i>N. fuckeliana</i> en plantas inoculadas	11
4.2	Reaislamientos	13
5	DISCUSIÓN	15
6	CONCLUSIONES	18
7	REFERENCIAS	19
Anexos	1 Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, de la longitud de la lesión sobre la herida de inoculación.	
	2 Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, de la longitud de la lesión bajo la herida de inoculación.	
	3 Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, del desarrollo del hongo por medio de reaislamientos sobre la herida de inoculación.	
	4 Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, del desarrollo del hongo por medio de reaislamientos bajo la herida de inoculación.	

Calificación del Comité de Titulación

	Nota
Patrocinante: Sr. Rodrigo Morales Ramírez	6,4
Informante: Sra. Isabel Vives González	6,5
Informante: Sr. Juan Carlos Carmona Sepúlveda	6,3

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

Mis sinceros agradecimientos al profesor Rodrigo Morales patrocinante de este Trabajo de Titulación, por la confianza y oportunidad de poder desarrollar este estudio bajo su tutela, por sus comentarios y valiosa guía, ya que sin ellos no hubiera podido desarrollar con éxito este trabajo. También quiero agradecer a la profesora Isabel Vives por sus correcciones a este escrito y ayuda fundamental en los procedimientos de laboratorio, como también al Ingeniero Forestal Juan Carlos Carmona por sus revisiones y oportunos comentarios. Por otra parte agradezco a la Ing. Forestal Isabel Saavedra por su importante colaboración en el trabajo de laboratorio.

Agradezco al Proyecto Fondo SAG “Ciclo biológico y aspectos epidemiológicos de *Neonectria fuckeliana* o Revirado del Pino en plantaciones de *Pinus radiata*. Estrategias para el control de la enfermedad”, por el financiamiento de este estudio, como también al Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales de la UACH, por brindarme el espacio físico para el análisis y almacenamiento de las plantas del ensayo.

A mis compañeros y compañeras, por el apoyo y ayuda brindada en las múltiples materias de la carrera, y agradecer a todos los funcionarios de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, que de algún u otro modo contribuyeron a mi formación profesional.

Por último doy las gracias a Dios y a mis Padres por ayudarme en todo momento de esta etapa, por su apoyo y constancia brindada cada día.

Dedicado a mis Padres ...

RESUMEN

En el año 2008 se detectó en Chile, en la Región de La Araucanía, el patógeno *Neonectria fuckeliana*, organismo causante de malformaciones fustales y canchros en plantaciones de *Pinus radiata*. Este hongo es originario del hemisferio norte, donde se desarrolla como saprófito, y en Nueva Zelanda causa serios daños en plantaciones de *P. radiata* podadas. Debido a lo reciente de su hallazgo en Chile, el presente Trabajo de Titulación tuvo por objetivo estudiar el comportamiento patogénico de *N. fuckeliana*, bajo condiciones de laboratorio en plantas de vivero de *P. radiata* de seis meses de edad. Para ello se emplearon dos métodos de inoculación en el tallo, utilizando el estado anamorfo *Acremonium-like*. El primero correspondió a la inoculación con micelio y el segundo con una suspensión de conidias. Los síntomas se presentaron en ambos métodos, manifestados por un cambio de color y depresión en el tejido por sobre y bajo el punto de inoculación. El desarrollo visual del patógeno en el tallo después de 15 semanas, fue de 12 mm en el método con micelio y de 6 mm con el método de suspensión de conidias. En ambos métodos el desarrollo del patógeno fue mayor bajo el punto de inoculación. En cuanto a los reaislamientos desde el tallo, en el método empleando micelio, el patógeno se obtuvo en el 60% de las plantas, y el desarrollo promedio del hongo en los tejidos internos de las plantas fue de 40 mm. En el método empleando suspensión de conidias, el patógeno solo se aisló en el 20% de las plantas, y el desarrollo al interior de éstas fue de 25 mm. Estos antecedentes demuestran la patogenicidad de *N. fuckeliana* empleando ambos métodos, pero con una mayor efectividad utilizando micelio como inóculo.

Palabras clave: *Pinus radiata*, *Acremonium-like*, Postulados de Koch.

1. INTRODUCCIÓN

Pinus radiata D. Don es la principal especie forestal plantada en Chile, y es la especie base de la economía forestal en el país. Debido a ello, es que cualquier factor de daño, sea éste biótico o abiótico que afecte su productividad se torna de relevancia.

En el año 2008 se detectó el patógeno *Neonectria fuckeliana* (C. Booth) Castl. & Rossman (sin. *Nectria fuckeliana*) en la zona de Toltén, Región de La Araucanía. Este patógeno afecta plantaciones de *P. radiata*, causando la muerte del tejido cortical (cancros) asociados a los muñones de poda, donde el patógeno hace ingreso.

Neonectria fuckeliana es un hongo que pertenece a la División Ascomycota, y es originario del hemisferio norte donde está asociado a la formación de canchros en coníferas como *Abies*, *Larix*, *Picea* y *Pinus*, sin causar graves daños, a diferencia de lo que ocurre en Nueva Zelanda, donde se detectó en el año 1996 y actualmente se presenta en una área de ocurrencia de 90.000 ha en plantaciones de *P. radiata*.

Debido al potencial riesgo de dispersión de esta enfermedad en las plantaciones de *P. radiata* en Chile, se hace necesario evaluar su patogenicidad para conocer el comportamiento del patógeno. De esta forma desarrollar protocolos de inoculación para realizar pruebas de selección genética como medidas de control a mediano y largo plazo.

El objetivo principal de este estudio es evaluar el grado de patogenicidad que tiene *N. fuckeliana* en plantas de vivero de *P. radiata*, abordando los siguientes objetivos específicos:

- Observar la presencia de sintomatología en plantas de vivero de *P. radiata* inoculadas.
- Evaluar los métodos de inoculación empleados en el ensayo.
- Evaluar el porcentaje de infección y desarrollo del patógeno en las plantas inoculadas.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Descripción general del patógeno

El patógeno *N. fuckeliana* anteriormente llamado *Nectria cucurbitula* (Tode: Fr.) o también *Nectria abietis* Sacc. [ut Sac.] (Brayford *et al.* 2004), es el causante de la enfermedad llamada “Fluting” o “Acanaladuras” del *Pinus radiata*. La enfermedad se caracteriza por la muerte del cambium, y formación de canchales, causando la pérdida de la calidad en la primera troza (Power y Ramsfield 2007).

Este patógeno es originario del hemisferio norte donde afecta a diversos géneros de coníferas como *Abies*, *Larix*, *Picea* y *Pinus*, invadiendo heridas naturales y actuando como saprófito o débilmente patógeno (Dick y Crane 2009).

El primer informe de este patógeno fue en 1937 en la isla de Anticosti en Quebec, Canadá afectando a *Abies balsamea* (L.) Mill y *Abies concolor* (Gordon & Glen.) Lind. (Schultz y Parmeter 1990). Uno de los países más afectados por este patógeno ha sido Nueva Zelanda, donde infecta plantaciones podadas de *P. radiata*. En este país se detectó en el año 1996 como agente de daños, sin embargo existe un informe de 1949 donde se identificó con el nombre de *Nectria pinea* en la localidad de Whakarewarewa, Rotorua, en la isla norte afectando a *P. radiata* (Dingley 1951). Sin embargo en la actualidad sólo se ha identificado en la mitad de la isla sur, en alrededor de un 25% de las plantaciones de *P. radiata*, con mayor incidencia en la zona costera (Bulman 2007).

En Chile este patógeno fue reportado en el año 2008 en plantaciones de *P. radiata* de la zona de Toltén, Región de La Araucanía, donde se observaron malformaciones y acanaladuras fustales (Morales 2009).

2.2 Taxonomía de *N. fuckeliana*

Neonectria fuckeliana pertenece a la división Ascomycota, Orden Hypocreales. Este hongo presenta ascosporas hialinas o débilmente coloreadas en la madurez, de forma fusiformes a elipsoides, provistas de un único septo o tabique transversal, con paredes finas, su tamaño va desde los 12-16 µm de largo por 5-6 µm de ancho, siendo su rango óptimo de temperatura para el crecimiento y germinación entre los 18-25°C con clima húmedo, las que son dispersadas por lluvia y viento. Las ascosporas se encuentran en el interior de los ascos, que van desde 86-120 µm de largo por 7-9 µm de ancho y contienen ocho ascosporas en su interior. Los ascos se encuentran en el interior de los cuerpos

fructíferos llamados peritecios, que crecen en forma grupal sobre la corteza de los árboles más afectados, y son de forma esférica con una abertura apical llamada ostiolo, y un diámetro de 300 a 400 μm , los cuales se pueden apreciar a simple vista en la corteza de los árboles por su color rojo (Dick *et al.* 2006, Brayford *et al.* 2004).

Este patógeno posee dos estados anamorfos, uno corresponde a *Cylindrocarpon cylindroides* var. *tenue* y el otro a un estado intermedio llamado *Acremonium-like*, de los cuales el primero no se ha presentado en aislamientos de laboratorio (Brayford *et al.* 2004).

El anamorfo *C. cylindroides* se caracteriza por sus macroconidias, aunque en muchas cepas están ausentes o en baja proporción, éstas son de 30 a 80 μm de largo por 4,5 a 6,5 μm de ancho, de formas cilíndricas, rectas o ligeramente curvadas con extremos redondeados, y poseen de 1 a 7 septos, aunque lo más común es encontrar de 3 a 5 septos (Brayford *et al.* 2004).

A pesar que la relación de *Neonectria* con *Cylindrocarpon* es conocida, éste no se ha podido encontrar o desarrollar en aislamientos a partir de ascosporas. Sin embargo es posible encontrar preferentemente el estado anamorfo *Acremonium-like*. Éste en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) desarrolla colonias de color blanco, gris rosado o naranja, y de márgenes blanquecinos. Las estructuras presentes en *Acremonium-like* son: conidiofóros, fiálides y conidias, estas últimas son unicelulares y excepcionalmente bicelulares, ligeramente curvas, mientras que las fiálides tienen forma de punzón septadas en la base y crecen libres o en verticilos. Las medidas de las conidias van desde los 3 a 7 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho, mientras que las fiálides son de 30 a 70 μm de largo y 1,5 a 3,5 μm de ancho (Brayford *et al.* 2004, Molina 2010).

2.3 Sintomatología y daños

El patógeno ingresa a la planta a través de heridas que son producidas por las podas, o en las inserciones de las ramas (verticilos) cuando existe muerte de éstas (Peace 1962). Luego que el patógeno ingresa al árbol, se nutre de las células del cambium causando la muerte de éstas produciendo los canchales. Los primeros síntomas de la necrosis en el fuste se presentan a la temporada siguiente de la infección. Estos síntomas corresponden a depresiones o acanaladuras en el fuste sobre el muñón podado, además generan malformaciones en forma de espiral a lo largo del fuste que pueden persistir hasta la edad de rotación (Figura 1). Aunque en muchos casos estas depresiones no son lo suficientemente profundas en el árbol, pueden recuperarse después de cinco años quedando la evidencia del daño bajo la corteza (Hopkins y Dick 2009). Esta muerte de tejido también provoca que árboles

adultos aumenten la producción de resina, taninos y fenoles, los que actúan como verdaderos atrayentes para otro tipo de organismos. A pesar de que el hongo ataca la zona cambial, éste no anilla el árbol por completo, por lo que la copa no se ve afectada, y solo en casos extremos puede producir la muerte (Dick *et al.* 2006).



Fotos: Cristian González

Figura 1. Daños causados por *N. fuckeliana* en plantaciones de *P. radiata* en Chile (flechas indican muñones podados).

2.4 Patogenicidad de *N. fuckeliana*

Se han realizado diversos estudios para determinar la capacidad de *N. fuckeliana* para infectar y producir daños en coníferas, especialmente *P. radiata* (Shultz y Parmeter 1990, Dick 2005, Dick 2007, Dick y Crane 2009).

Inoculaciones realizadas en plantas de vivero de *P. radiata* demuestran un alto porcentaje de infección, con 91% después de seis semanas desde la inoculación, donde las plantas permanecieron en condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo (Dick 2005). Las inoculaciones fueron realizadas con heridas en el ápice de 11 plantas con una suspensión de conidias de 1×10^7 conidias ml^{-1} .

Se evaluó la lesión en el tejido cercano a la herida, siendo el promedio de ésta entre 1,5 a 2,0 mm de largo en la mayoría de las plantas (Dick 2005). Sin embargo existen otros estudios utilizando plantas de vivero de *P. radiata*, donde inoculadas con suspensión de conidias de 5×10^3 conidias ml^{-1} y en condiciones ambientales de terreno, se obtuvo un 24% de reaislamientos positivos después de tres meses, y luego de 12 meses un 3,5% de un total de 110 plantas (Dick 2007).

3. MÉTODOS

3.1 Preparación del inóculo y características de las plantas del ensayo

Se utilizaron tres cepas del estado anamorfo *Acremonium-like* (Figura 2 A), las que fueron rotuladas como cepa “uno”, cepa “dos” y cepa “tres”, procedentes de la zona de Toltén, y que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales.

El inóculo utilizado correspondió a dos tipos: uno sólo con micelio y otro con una concentración conocida de conidias (Figura 2 B y C). El primer inóculo se obtuvo de cultivos del hongo en agar extracto de malta al 2% almacenados en estufa de cultivo a 23°C por 20 días, de esta manera se logró el desarrollo del estado anamorfo de *N. fuckeliana*, *Acremonium-like*, para realizar el ensayo.

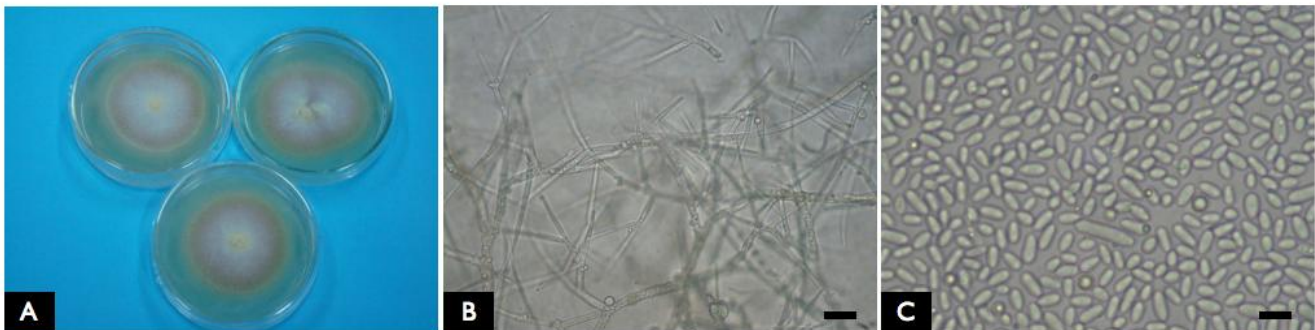


Figura 2. Cepas y tipos de inóculo. A) Cultivo. B) Micélio. C) Conidias de *Acremonium-like*. (barra= 5 μm).

El segundo tipo de inóculo correspondió a una concentración conocida de conidias, la cual se obtuvo realizando un barrido con agua destilada estéril sobre las colonias desarrolladas en agar extracto de malta al 2%. El contenido se vació a un matraz con 50 ml de agua destilada estéril, posteriormente se procedió a contar las conidias por milímetro de la suspensión en una cámara de conteo de Neubauer (French y Hebert 1980) y luego ajustar la suspensión a la concentración deseada de 1×10^7 conidias ml^{-1} .

Las plantas utilizadas en el ensayo se obtuvieron del vivero La Quila, ubicado a 15 km al norte de Valdivia, y correspondieron a plantas de semillas de *P. radiata* de 6 meses de edad del clon UA0013, provenientes de un huerto semillero de clones de la empresa forestal MASISA S.A. Estas plantas se encontraban en contenedores de poliestireno expandido de 104 cavidades de 80 cc y sustrato de corteza de pino compostada que contenía un fertilizante de lenta entrega.

Las plantas presentaron un diámetro altura de cuello (DAC) promedio de 4,0 mm y 23 cm de altura total.

3.2 Métodos de inoculación

La inoculación de las plantas se realizó mediante dos métodos: micelio y suspensión de conidias.

El primer método consistió en inocular las plantas con un trozo de micelio para lo cual se extrajo las acículas a la altura media de la planta (zona de inoculación) y se realizó una herida de aproximadamente 5x3 mm simulando una ventanilla que se denominó herida “a” (Figura 3 A), luego se tomó una sección de 5 mm de diámetro de colonia (micelio) con agar para introducirlo en la herida (Figura 3 B y C), se cubrió la incisión con papel absorbente que fue humedecido con agua destilada estéril y sellado con Parafilm (Figura 3 D, E, F).

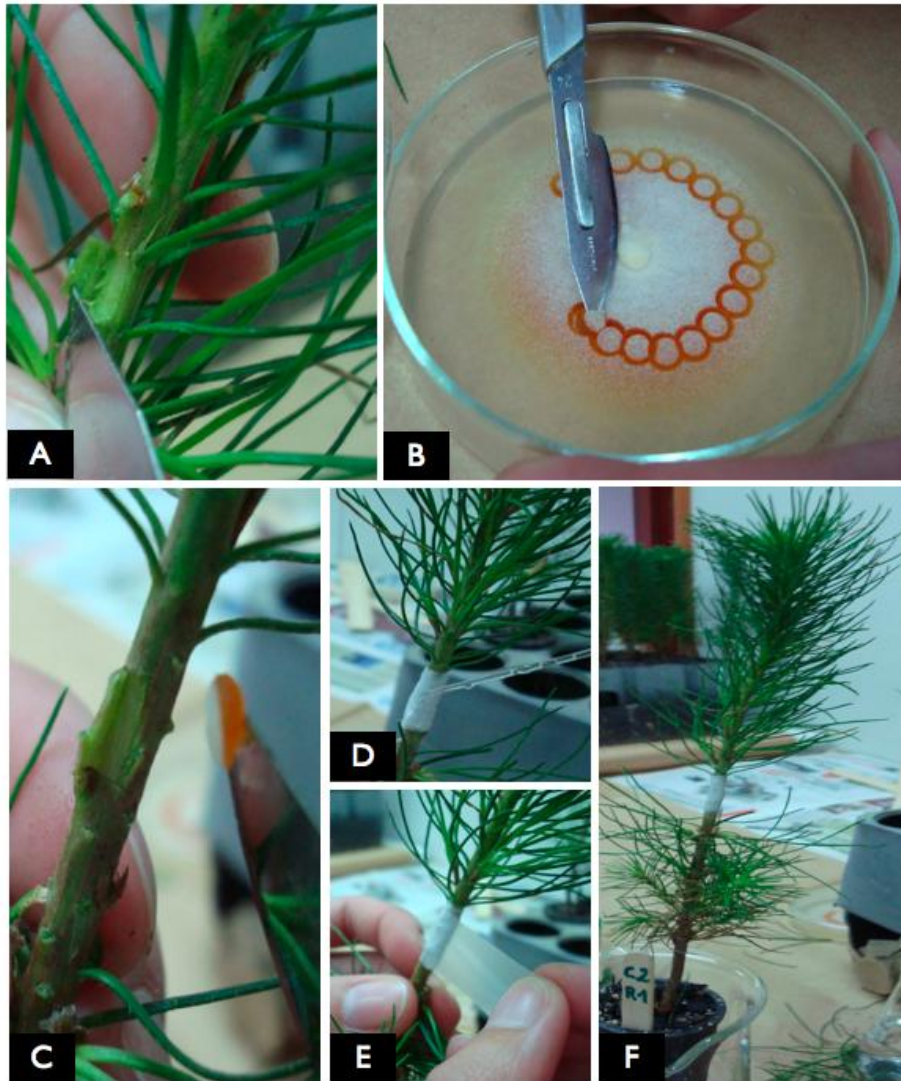


Figura 3. Etapas del primer método de inoculación. A) Herida tipo “a”, forma de ventanilla. B-C) Toma e introducción de inóculo en la planta. D-E) Sellado con papel absorbente y Parafilm. F) Planta inoculada.

El segundo método correspondió a la inoculación con concentración de conidias (1×10^7 conidias ml^{-1}), en este caso la herida se realizó en forma tangencial al eje del tallo de la planta, a la altura media de ésta con una longitud de 3 mm, y que se denominó herida “b” (Figura 4 A y B). En esta herida se introdujo con una micropipeta 20 μl de la suspensión de conidias (Figura 4 C y D), posteriormente la herida fue sellada con un trozo de Parafilm (Figura 4 E y F).

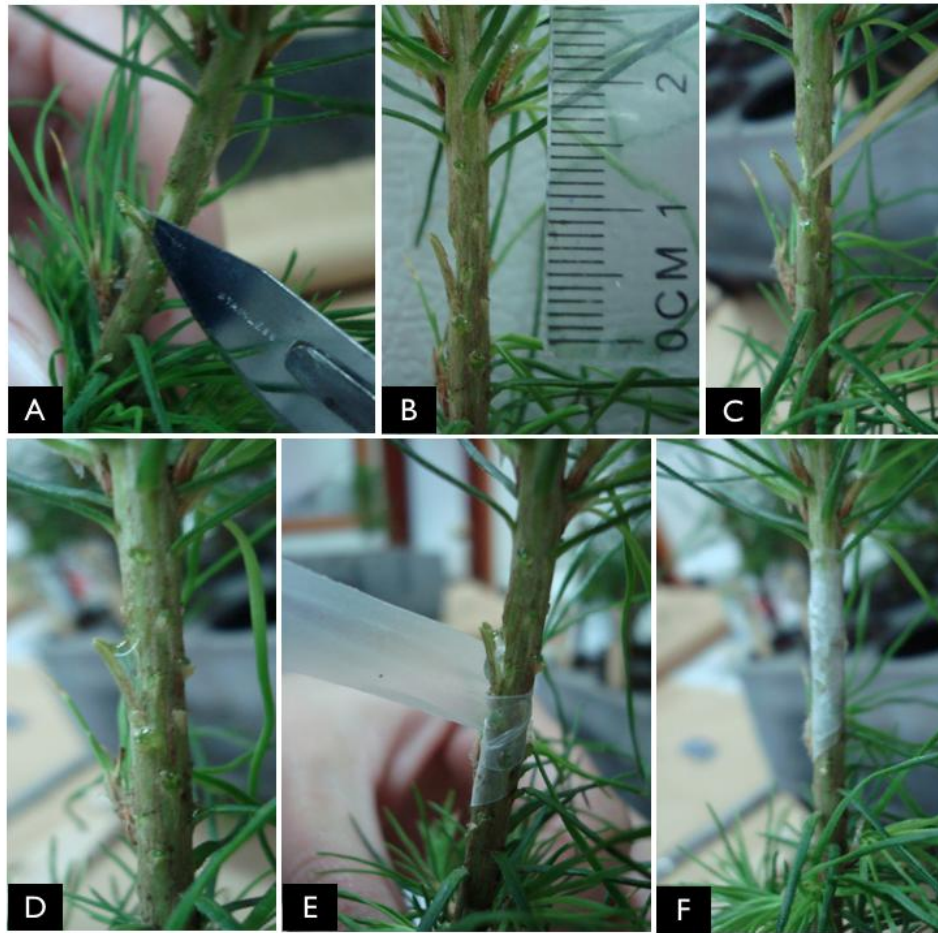


Figura 4. Etapas del segundo método de inoculación. A-B) Herida tipo “b”, forma tangencial. C-D) Introducción de inóculo por medio de micropipeta. E) Sellado de herida con Parafilm. F) Planta inoculada.

Luego de las inoculaciones, las plantas fueron rotuladas y establecidas en bandejas plásticas, donde cada una almacenó 45 plantas (Figura 5), bajo condiciones ambientales controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo.



Figura 5. Rotulación y establecimiento de bandejas en cámara de cultivo.

3.3 Diseño y metodología de evaluación del ensayo de patogenicidad

El ensayo contó con un total de cinco tratamientos ordenados de forma alfabética, siendo A y B, los tratamientos con inoculación de micelio (herida “a”), y conidias (herida “b”) respectivamente. Los tratamientos C, D y E corresponden a los de control, donde C, se realizó el tipo de herida “a” con agua destilada estéril, el tratamiento D con agua destilada estéril, y herida “b”, y por último el tratamiento E se desarrolló en plantas sin ningún tipo de herida ni inoculación.

En el cuadro 1 se observa el diseño del ensayo, los tratamientos utilizados y el número de repeticiones (R) por cada cepa, donde cada repetición tuvo cinco plantas. La cantidad de plantas utilizadas en el ensayo fue de 135.

Cuadro 1. Diseño experimental del ensayo de patogenicidad.

Cepa	Tratamientos				
	A	B	C	D	E
	Tipo de herida e inóculo				
	Herida “a”, micelio	Herida “b”, concentración de conidias	Testigo herida “a”, H ₂ O destilada estéril	Testigo herida “b”, H ₂ O destilada estéril	Testigo sin inoculación
1	R1	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3	R3
2	R1	R1	-	-	-
	R2	R2	-	-	-
	R3	R3	-	-	-
3	R1	R1	-	-	-
	R2	R2	-	-	-
	R3	R3	-	-	-
Total plantas	45	45	15	15	15

R: repetición equivale a cinco plantas.

- : sin repetición.

El ensayo tuvo una duración de 15 semanas, durante el 30 de julio y 15 de noviembre del año 2010. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo, la cual registró temperaturas de 20±3°C y humedad relativa entre 50 y 70%, con un fotoperiodo de 10 horas luz. El riego fue cada dos días durante el periodo de ensayo.

La evaluación del ensayo se realizó cada dos semanas, observando la presencia de síntomas característicos de la enfermedad, y midiendo la lesión en el caso de que ésta se estuviera produciendo. Al final del ensayo se realizaron reaislamientos del patógeno de todas las plantas (Dick 2005), cumpliendo de esta forma con los postulados de Koch, determinando el porcentaje de infección y el desarrollo del patógeno en las plantas.

El método utilizado para los reaislamientos, consistió en extraer la totalidad de acículas del tallo y seccionar éste en trozos de 10 cm, contando 5 cm hacia arriba y bajo del punto de inoculación. Posteriormente este trozo se pasó por protocolo de desinfección (Molina 2010), para ser seccionado en trozos de 1 cm y sembrarlos en agar extracto de malta al 2% (Figura 6), proceso realizado bajo cámara de flujo laminar. Por último las placas se mantuvieron en estufa de cultivo a 23°C por siete días, para proceder a evaluar el desarrollo de la infección de *N. fuckeliana* en las plantas.

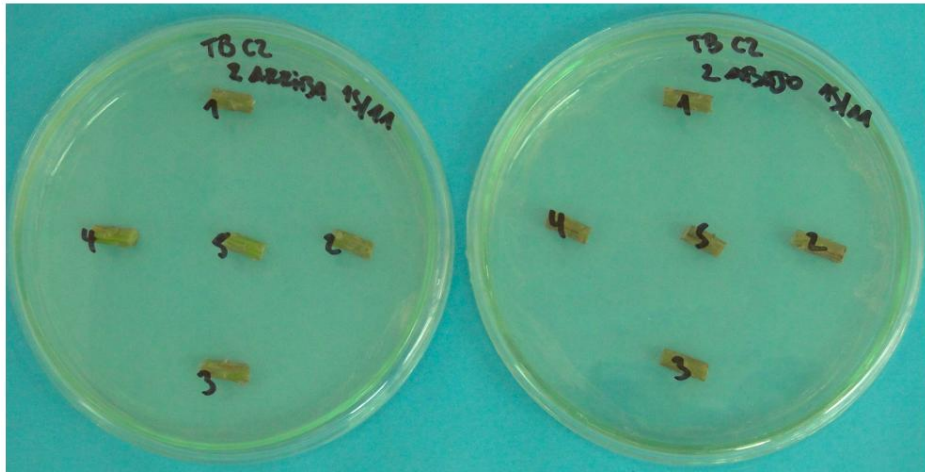


Figura 6. Reaislamientos de *N. fuckeliana* de plantas inoculadas, a partir de trozos de tallo.

El procesamiento de datos se realizó mediante análisis de varianza paramétrico de un factor utilizando la repetición como unidad muestral, para comprobar la existencia de efectos significativos de los tratamientos (Sokal y Rohlf 1980, Morales 2005). La identificación de los tratamientos que tuvieron diferencias significativas entre si, se realizó por medio de la prueba de multicomparación de medias de Tukey con un 95% de confianza. El software utilizado para esto fue STATGRAPHICS Plus 5.1.

4. RESULTADOS

4.1 Desarrollo de *N. fuckeliana* en plantas inoculadas

Durante el periodo del ensayo, las plantas tuvieron un crecimiento medio en altura de 3 cm en todos los tratamientos, resultando alturas finales entre 25 a 26 cm. En el caso del diámetro de cuello no existieron incrementos en ninguno de los tratamientos (Cuadro 2).

Durante las primeras semanas del ensayo, el ataque de patógenos oportunistas generó mortalidad en todos los tratamientos, desde un 10% en el tratamiento E, hasta 44% en el tratamiento A. Sin embargo el número final de plantas fue adecuado para los análisis posteriores, siendo el número más reducido en el tratamiento C (Cuadro 2).

La presencia de síntomas atribuibles a *N. fuckeliana* fue mayor en el tratamiento A con un 64%, a diferencia del tratamiento B con 54%, los tres tratamientos testigos (C, D, E) no presentaron ningún tipo de síntoma en las plantas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Mortalidad y porcentaje de plantas con presencia de síntomas de *N. fuckeliana* por tratamiento.

Tratamiento	Mortalidad (%)	Presencia de síntomas (%)
A	44,4	64
B	22,2	54
C	26,6	0
D	20,0	0
E	13,3	0

Los síntomas observados consistieron en lesiones manifestadas por cambio de color en la corteza desde el punto de inoculación hacia la parte apical y parte baja de la planta, existiendo una leve depresión en el tejido cercano a la herida de inoculación en las plantas del tratamiento A (Figura 7 A). Para el tratamiento B, el daño fue en ambos sentidos, produciendo el mismo color de tejido necrosado que el tratamiento A (Figura 7 B). Los tratamientos C y D no presentaron ningún tipo de alteración en el tejido cercano a la herida (Figura 7 C y D), esto mismo ocurrió en el tratamiento E (Figura 7 E)

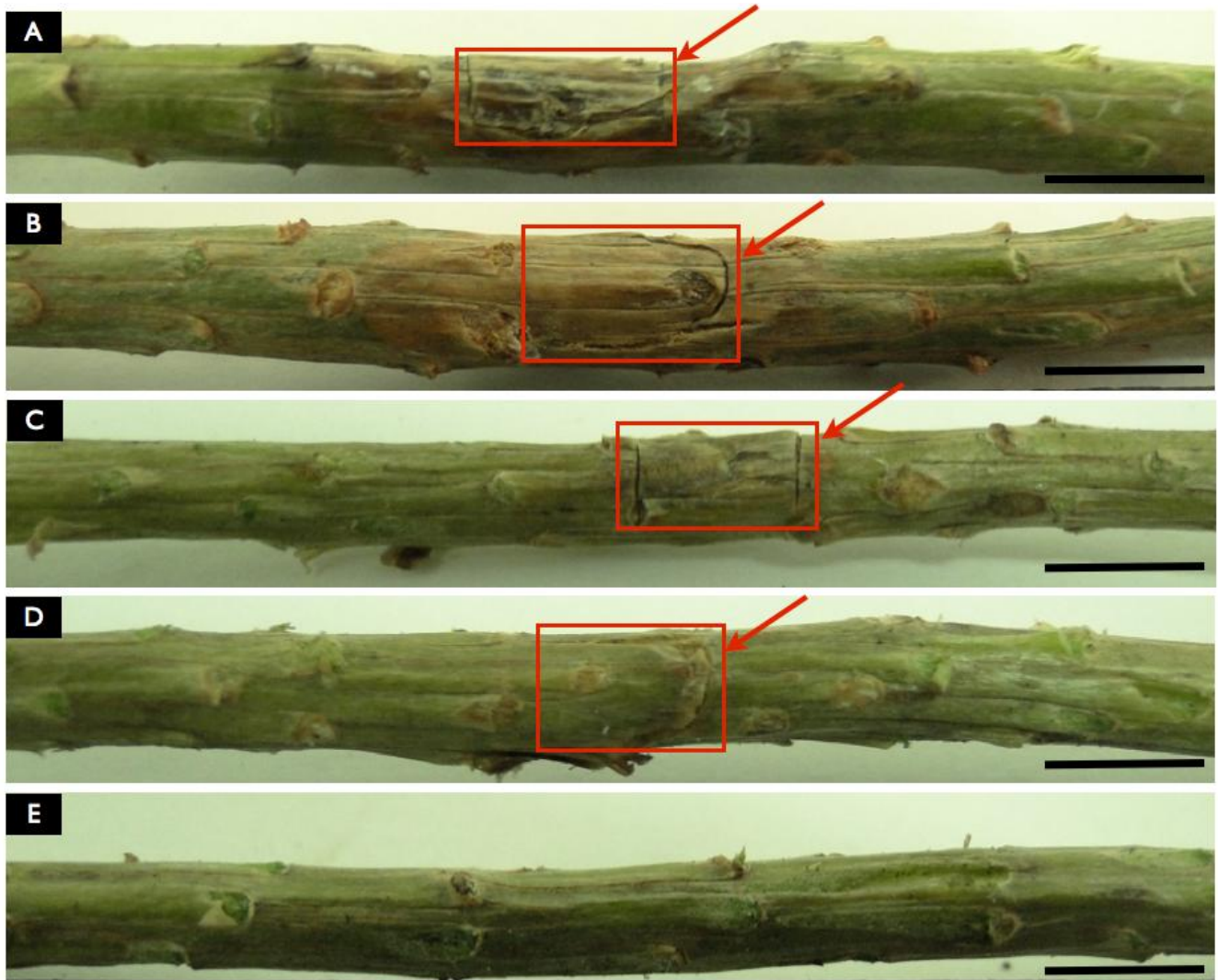


Figura 7. Desarrollo de *N. fuckeliana* en plantas inoculadas. A) tratamiento A (micelio). B) tratamiento B (concentración de conidias). C) tratamiento C (testigo, herida “a”). D) tratamiento D (testigo herida “b”). E) tratamiento E (testigo sin herida). (Flechas indican posición de la herida) (Barra representa 5 mm).

La longitud total que alcanzó el desarrollo del patógeno fue de 12 mm para el tratamiento A, y para el tratamiento B no superó los 6 mm. Sin embargo en ambos tratamientos el tamaño de la lesión fue mayor en la zona bajo la herida, existiendo diferencias significativas entre tratamientos, esta misma diferencia se generó en la zona sobre la herida de inoculación, la cual alcanzó 5 mm en el tratamiento A y 2 mm en el tratamiento B (Figura 8) (Anexo 1 y 2).

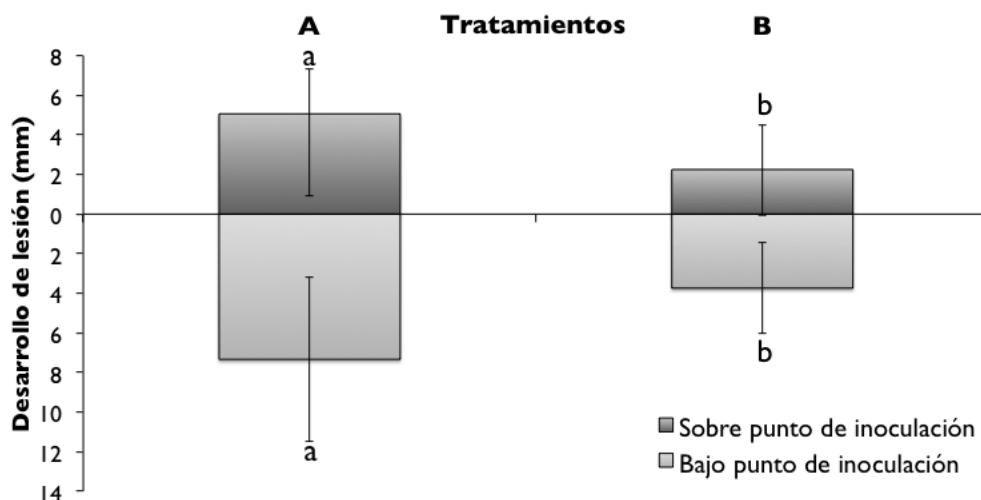


Figura 8. Desarrollo visual en la planta de *N. fuckeliana* sobre y bajo la herida de inoculación en cada tratamiento, Líneas sobre y bajo la columna indican desviación estándar. Letras A y B representan los métodos de inoculación empleados. Letras a y b indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

4.2 Reaislamientos

La presencia del patógeno en los reaislamientos se registró en los tratamientos con inoculación con micelio (tratamiento A) y concentración de conidias (tratamiento B). Sin embargo también existió el desarrollo de otros agentes secundarios en los reaislamientos, pero que no impidieron la identificación de las colonias. Estas colonias fueron sembradas nuevamente en agar malta al 2% (cultivos puros) para su comprobación por medio de claves taxonómicas (Domsch *et al.* 1980, Brayford *et al.* 2004) (Figura 9).

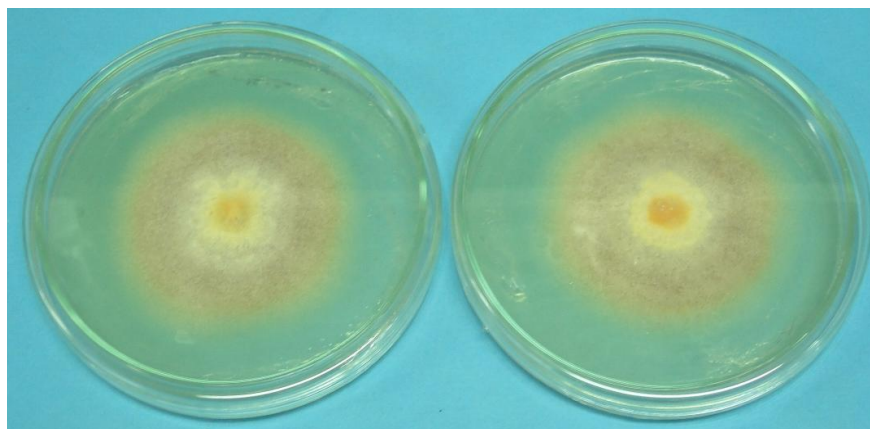


Figura 9. Colonias de *N. fuckeliana* obtenidas desde los reaislamientos.

En los tratamientos donde se identificó el patógeno, éstos presentaron diferencias de infección del 60% en las plantas del tratamiento A, y 20% en el tratamiento B (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de plantas y reaislamientos positivos por tratamiento.

Tratamiento	Número de plantas	Reaislamientos positivos (%)
A	25	60
B	35	20
C	10	0
D	10	0
E	10	0

El desarrollo del patógeno por medio de la identificación de las colonias en los reaislamientos, fue de 20 mm sobre y bajo la herida en el tratamiento A, y de 15 mm sobre la herida y 12,5 mm bajo ésta en el tratamiento B (Figura 10). El desarrollo total al interior de la planta fue de 40 mm en el tratamiento A y de aproximadamente 25 mm en el tratamiento B.

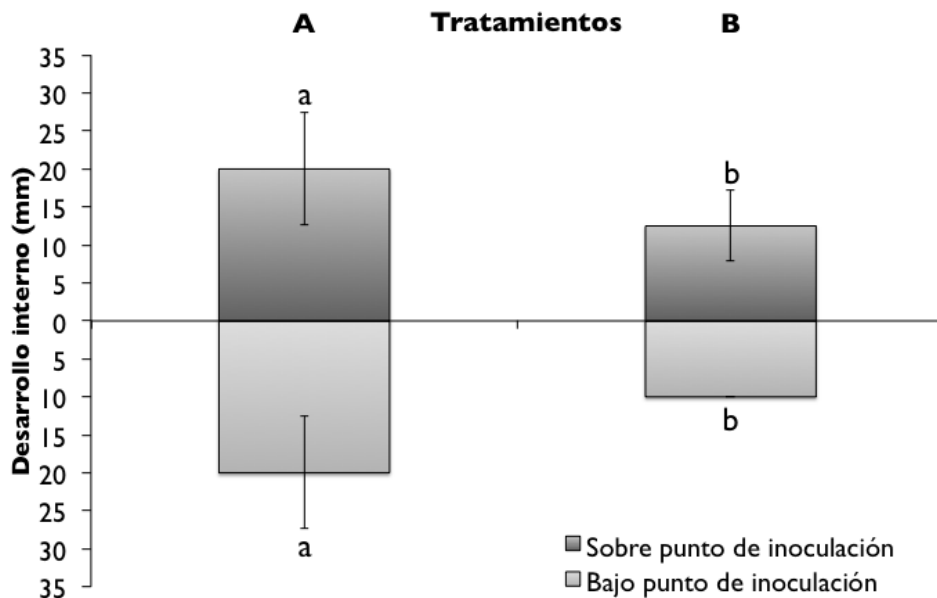


Figura 10. Desarrollo del patógeno en el interior de la planta, identificado por medio de los reaislamientos en cada tratamiento, líneas sobre y bajo la columna indican desviación estándar. Letras A y B representan los métodos de inoculación empleados. Letras a y b indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Al igual que el desarrollo visual del daño, el resultado de los reaislamientos demuestran que hay diferencias significativas entre tratamientos (Figura 10), ya sea en el caso del desarrollo por sobre la herida como por debajo de esta (Anexo 3 y 4).

En cuanto a las cepas dentro de los tratamientos (A y B), no presentaron diferencias significativas en el desarrollo del patógeno por sobre y bajo el punto de inoculación, no demostrando diferencia de patogenicidad entre cepas

5. DISCUSIÓN

La mortalidad de las plantas producida durante las primeras semanas del ensayo en todos los tratamientos, se debe a que las heridas provocadas para la inoculación y las condiciones favorables de temperatura ($20\pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (70-80%), generaron la presencia de otros agentes patógenos, en este caso oportunistas, que provocaron la muerte de plantas en todos los tratamientos. Esto descarta la posibilidad de que *N. fuckeliana* sea el responsable, ya que en los tratamientos sin inoculación y sin herida (C, D, E) también ocurrió esta mortalidad

La presencia de estos patógenos oportunistas, se puede explicar debido a que las plantas provenían de vivero al igual que el sustrato, y al establecer el ensayo en condiciones ambientales favorables, se manifestaron provocando la muerte de las plantas.

La presencia de síntomas en las plantas inoculadas fue clara, esto demuestra la capacidad del patógeno de producir lesiones en el tallo, por sobre y bajo la herida de inoculación. Esta sintomatología coincide con el trabajo de Dick (2005), donde se realizaron inoculaciones con el anamorfo *Acremonium-like* en plantas de vivero *P. radiata*, observando el mismo tipo de síntomas luego de seis semanas del ensayo.

El desarrollo del patógeno en las plantas inoculadas, genera un lento avance de lesión en comparación a lo observado en inoculaciones en árboles de terreno, donde el patógeno presenta un mayor desarrollo del avance de la lesión. Este comportamiento se podría explicar por las condiciones ambientales, lo que podría favorecer el desarrollo del patógeno (humedad relativa, temperatura ambiental, fotoperiodo, precipitación, etc.) o por la edad y constitución anatómica y química de la madera del árbol, ya que las plantas de vivero presentan en menor proporción componentes de albura y cambium, que en árboles de mayor edad¹. Esto queda demostrado en el trabajo de Dick y Crane (2009)

¹ Margaret Dick, 2010, SCION Nueva Zelanda, Comunicación Personal.

donde se inoculó árboles de seis años, con heridas a distintas profundidades en la madera, resultando que en la zona de la albura el patógeno se desarrolla más rápido y en mayor extensión, lo que causa zonas de mayor tamaño necróticas que dan origen a los canchros (Dick y Crane 2009, Peace 1962). Este desarrollo produjo una lesión de 150 mm, después de siete meses desde la inoculación, es decir la lesión fue mayor que lo registrado en las plantas de vivero, debido a los factores anteriormente mencionados, a pesar de que éste último ensayo permaneció por mas tiempo (Dick y Crane 2009).

La lesión desarrollada en las plantas durante los tres meses que duró el ensayo, no produjo la muerte de éstas, demostrando un desarrollo lento y débil en comparación a otros patógenos que afectan a *P. radiata*, como por ejemplo el caso de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton, el cual en inoculaciones realizadas al ápice del tallo en plantas de vivero *P. radiata*, muestran el comportamiento de un patógeno agresivo, provocando la muerte luego de tres semanas de transcurrido el ensayo y logrando un desarrollo de 240 mm en el tallo (Morales 2007).

La diferencia en porcentaje de plantas con síntomas en los tratamientos A y B, se debe a que al introducir la suspensión de conidias a la planta, parte de ésta suspensión pudo haber escurrido por el tallo durante el sellado de la herida con Parafilm, produciendo que un bajo porcentaje de éstas quede al interior de la herida en la planta. Por otro lado, las conidias necesitan germinar y luego infectar los tejidos (Agrios 2005), lo que puede retrasar el tiempo de colonización y desarrollo interno en la planta, a diferencia de lo que sucede con el micelio, que al introducirlo en la herida comienza de inmediato con la infección y luego colonización de los tejidos, requiriendo un menor tiempo que las conidias, siendo éste método más efectivo y rápido en producir lesiones en las plantas.

En cuanto a los reaislamientos el porcentaje de éstos en el tratamiento A está muy por encima de lo logrado en el tratamiento B. Aunque estudios de Dick (2005) lograron porcentajes de reaislamientos del 100% en plantas inoculadas con conidias bajo condiciones artificiales. Sin embargo, en el estudio de Dick y Power (2007), inoculando bajo condiciones ambientales naturales luego de tres meses, se pudo reaislar solo el 24% de las plantas inoculadas, cifra similar a la obtenida en el tratamiento B de este estudio. Este bajo porcentaje de reaislamientos positivos se puede explicar debido a que el desarrollo del patógeno, produce un tejido necrótico cercano a la herida, que es colonizado por agentes saprofitos, los cuales pueden inhibir el desarrollo del patógeno en los reaislamientos. Esto explica a su vez la diferencia entre el porcentaje de plantas con presencia de síntomas y el porcentaje de reaislamientos positivos en los tratamientos.

El desarrollo del patógeno al interior de las plantas puede llegar a ser tres veces más que el daño visual. Esta misma tendencia ocurre en plantaciones, ya que el desarrollo interior del patógeno es

siempre mayor a la longitud de los canchros².

A través de los reaislamientos se pudo comprobar que las diferencias en el desarrollo del patógeno entre los tratamientos, fueron a causa de los métodos de inoculación empleados y no a la patogenicidad de las cepas, ya que éstas no presentaron diferencias significativas de desarrollo en la planta. Esto se puede explicar a que las tres cepas empleadas en el estudio presentaron igual grado de patogenicidad o virulencia ya que provenían de un mismo lugar geográfico.

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

- Inocular plantas de mayor edad, considerando un periodo de tiempo mayor.
- Realizar inoculaciones con el estado sexual (ascosporas).
- Colectar diferentes procedencias geográficas de *N. fuckeliana* para probar su virulencia en plantas de *P. radiata*.

² Rodrigo Morales, 2010, Instituto de Silvicultura, Universidad Austral de Chile, Comunicación Personal.

6. CONCLUSIONES

- La capacidad de patogenicidad de *Acremonium-like* quedó demostrada en los dos tratamientos inoculados.
- El tratamiento “A” (inoculación con micelio) fue el método más efectivo en producir mayor porcentaje de plantas con síntomas y longitud de lesión.
- Las plantas inoculadas con micelio lograron mayor porcentaje de reaislamientos positivos de *Acremonium-like*, que las inoculadas con suspensión de conidias, además presentaron un mayor desarrollo en el interior del tallo.
- El desarrollo del patógeno en el interior de la planta es siempre superior en longitud que la lesión de daño visual en las plantas inoculadas.

7. REFERENCIAS

- Agrios G. 2005. Chapter two: Parasitism and Disease Development. *In* Agrios G. Eds. Plant Pathology. San Diego, USA. Elsevier Academic Press. p. 77-102.
- Crane P, A Hopkins, M Dick, L Bulman. 2009. Behaviour of *Neonectria fuckeliana* causing a pine canker disease in New Zealand. *Canadian Journal of Forest Research* 39: 2119-2128.
- Brayford D, B Honda, F Martini, G Samuels. 2004. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. *Mycologia* 96(3): 572–597.
- Bulman L. 2007. *Nectria* surveys. New Zealand, Rotorua. Forest Health News. 179: 2.
- Dick M. 2005. *Nectria fuckeliana* infection of nursery plants. Consultado 20 may. 2010. Disponible en http://www.fbrc.org.nz/pdfs/report_nectria_nursery_plants_ensis.pdf
- Dick M, L Bulman, P Crane. 2006. *Nectria fuckeliana* infection of *Pinus radiata* in New Zealand: Proceedings of the 53rd Western International Forest Disease Work Conference, Jackson USA, 26-30 september 2005.
- Dick M, M Power. 2007. *Nectria* infection of nursey stock. New Zealand, Rotorua. Forest Health News. 179: 2.
- Dick M, P Crane. 2009. *Neonectria fuckeliana* is pathogenic to *Pinus radiata* in New Zealand. *Australasian Plant Disease notes* 4: 12-14.
- Dingley JM. 1951. The genus *Nectria*. *In* Dingley JM. The Hipocreales of New Zealand. Transactions of the Royal Society of New Zealand. p. 177-202.
- Domsch K, W Gams, T Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. USA, Academic Press. v. 1, 859 p.

- French E, T Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 275 p.
- Hopkins A, M Dick. 2009. Nectria flute canker. Consultado 17 may. 2010. Disponible en http://www.scionresearch.com/__data/assets/pdf_file/0018/4185/Nectria-flute-canker.pdf
- Morales RA. 2007. 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. Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 25 p.
- Morales RA. 2009. Detección de *Neonectria fuckeliana* en Chile, asociado a canchros y malformaciones fustales en plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* (Chile) 30 (2): 106-110.
- Molina EJ. 2010. Caracterización de los estados anamorfos de *Neonectria fuckeliana* asociado a malformaciones en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don. Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Universidad Austral de Chile. 12 p.
- Morales EH. 2005. Diseño experimental a través del análisis de varianza y modelo de regresión lineal. Santiago, Chile. Andros. 248 p.
- Peace TR. 1962. Pathology of trees and shrubs. With special reference to Britain. Great Britain. Oxford University Press, 751 p.
- Power M, T Ramsfield. 2007. Detection of *Nectria fuckeliana* in wood cores from pruned and unpruned *Pinus radiata*. Second year results. Consultado 18 may. 2010. Disponible en http://www.fbrc.org.nz/pdfs/41261-Nectria_Report_Sept_2007.pdf
- Schultz M, J Parmeter. 1990. A Canker Disease of *Abies concolor* caused by *Nectria fuckeliana*. *Plant Disease* 74(2): 178-180.
- Sokal R, J Rohlf. 1980. Introducción a la bioestadística. Sevilla, España. Reverté. 357 p.

Wang W, D Thode. 2004. Nectria and the implications for radiata in Otago and Southland. *New Zealand Tree Grower* 25 (3): 12-12.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, de la longitud de la lesión sobre la herida de inoculación.

Análisis de Varianza					
Fuente	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	54,2411	1	54,2411	15,47	0,0006
Intra grupos	91,1875	26	3,50721		
Total (Corr.)	145,429	27			

P < 0,05 existe diferencia significativa

Anexo 2. Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, de la longitud de la lesión bajo la herida de inoculación.

Análisis de Varianza					
Fuente	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	108,424	1	108,424	7,21	0,0114
Intra grupos	481,018	32	15,0318		
Total (Corr.)	589,441	33			

P < 0,05 existe diferencia significativa

Anexo 3. Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, del desarrollo del hongo por medio de reislamientos sobre la herida de inoculación.

Análisis de Varianza					
Fuente	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,7	1	2,7	6,48	0,0203
Intra grupos	7,5	18	0,416667		
Total (Corr.)	10,2	19			

P < 0,05 existe diferencia significativa

Anexo 4. Análisis de varianza entre el tratamiento A y B, del desarrollo del hongo por medio de reislamientos bajo la herida de inoculación.

Análisis de Varianza					
Fuente	Sumas de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2,4	1	2,4	6,67	0,0273
Intra grupos	3,6	10	0,36		
Total (Corr.)	6,0	11			

P < 0,05 existe diferencia significativa