



INFORME FINAL
(Noviembre 2003 – Abril 2007)



Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell:
conocimiento del patógeno y establecimiento
de bases para su control en *Pinus radiata*.
(Código: C3-72-08-12)

RESPONSABLE DEL PROYECTO:

CONTROLADORA DE PLAGAS FORESTALES S.A.

EJECUTOR DEL PROYECTO:

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



Mayo 2007

INDICE

ÍTEM	Pág.
1. RESUMEN EJECUTIVO	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. PROPOSITO DEL PROYECTO	5
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
5. ZONA GEOGRAFICA DE EJECUCIÓN	9
6. FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO	9
7. PROPOSITO Y JERARQUIA DE OBJETIVOS DEL PROYECTO	9
8. ESTUDIOS Y RESULTADOS	13
9. ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN	180
10. LOGROS ALCANZADOS	182
11. RENDICIÓN DE GASTOS	185

ANEXO N° 1. DESCRIPCIÓN DE ITEMS DE GASTOS

1. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto tuvo como propósito obtener antecedentes del patógeno y de la enfermedad que permitan dar las bases para el manejo y el minimizar el impacto de *Fusarium circinatum*, especialmente en producción de plantas y de setos. El ámbito de los estudios propuestos es muy amplio, ya que está diseñado para obtener antecedentes básicos, simples y útiles.

En el periodo del estudio que fue de noviembre de 2003 a abril de 2007 se realizaron numerosos estudios en cinco líneas de acción:

- Conocer la diversidad genética de las poblaciones de *F. circinatum* presentes en Chile (Objetivo Específico 1).
- Obtener antecedentes sobre su patogenicidad y virulencia bajo diferentes condiciones de producción (Objetivo Específico 2).
- Diseñar una metodología para pruebas de resistencia en poblaciones de pino radiata en Chile (Objetivo Específico 3).
- Conocer sobre la supervivencia del patógeno y el movimiento y avance de la enfermedad (Objetivo Específico 4).
- Estudiar aspectos para su control (Objetivo Específico 5).

Los principales logros del proyecto se presentan en la página 182.

2. INTRODUCCIÓN

El hongo *Fusarium circinatum*, causante del cancro resinoso de los pinos (pitch canker), fue determinado por primera vez por Heptig y Roth en 1946, en Carolina del Norte, sobre *Pinus virginiana*. Originalmente, el patógeno fue considerado una especie de *Fusarium* en la sección Liseola del género. Sin embargo, apenas un par de años más tarde, el hongo fue identificado como *Fusarium lateritium* f.sp. *pini*, en la sección Lateritium y permaneció como tal hasta la década de los '70. En esa época, la ocurrencia de una epifitía causada por el hongo en el este de los Estados Unidos originó una serie de investigaciones que llevaron a re-estudiar el patógeno, el que reubicado de nuevo en la sección Liseola, bajo el nombre *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (Kuhlman *et al.* 1978). En 1983, fue propuesto elevar la variedad *subglutinans* a especie como *Fusarium subglutinans* (Nelson *et al.* 1983). Posteriormente, Correl *et al.* (1991) proponen la creación de una forma especial en la especie, ya que solamente los aislamientos de pino son patógenos a *Pinus*, y el hongo pasa a denominarse *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, conocido como FSP.

Recientemente, basado en estudios morfológicos y moleculares, Nirenberg y O'Donnell (1998) proponen, la denominación de *Fusarium circinatum*, con teleomorfo *Gibberella circinata*, para el *Fusarium* causante del cancro resinoso de los pinos.

Los cambios en la denominación del patógeno caracterizan una situación frecuente en el género *Fusarium*. En este género se ubican patógenos extraordinariamente importantes en cultivos agrícolas y frutales, así como saprofitos, y sus diferentes especies son estudiadas prácticamente en todos los países. El género se caracteriza por la producción de macroconidias y microconidias en mono o polifialides y clamidosporas, para la sección Liseola no hay clamidosporas (Figuras 1, 2, 3 y 4); durante años, la identificación de las especies se realizó por características morfológicas (tipo de esporas, forma, tamaño, etc.), por características de crecimiento en medios de cultivo y por su patogenicidad a ciertos huéspedes y no a otros. Es decir, para dos entidades morfológicamente similares, las pruebas de patogenicidad sobre un huésped dado indican una forma, variedad, raza o patotipo.

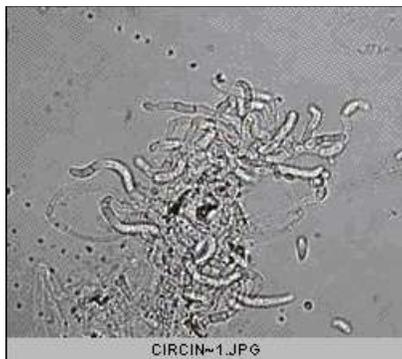


Figura 1.- Bucles y ovillos de micelio que originan el epíteto de "circinans"

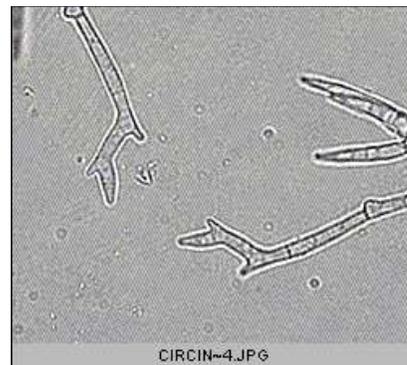


Figura 2.- Polifialides, en cada extremo se originan las conidias.

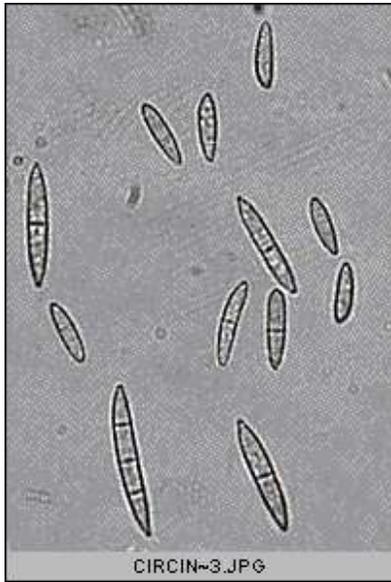


Figura 3.- Microconidias. 0 a 3 septas y de tamaño variable; obovoides (raro alantoides)

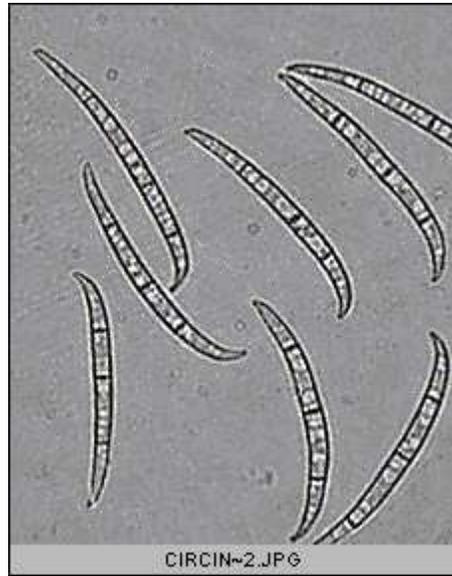


Figura 4.- Macroconidias. 3-5 septadas, relativamente rectas; célula apical curvada hacia adentro.

La identificación de las especies de *Fusarium* ha sido un problema frecuente y probablemente la dificultad se deriva de que la nomenclatura se basa en especímenes tipo, y la identificación se efectúa sobre cultivos puros, cuyas características son extremadamente variables, especialmente en medios de cultivos o cultivos sucesivos.

El uso de técnicas de biología molecular en la identificación está sirviendo a una identificación más precisa. Sin embargo, tales técnicas no entregan más antecedentes que los de identificación, siendo más útil cuando un mismo huésped puede sufrir ataques de diferentes *Fusarium*. En este proyecto, más orientado a la patología de *F. circinatum*, la identificación vía técnicas moleculares no es prioritario, ya que algunas características morfológicas de *F. circinatum* (polifialides, microconidia variable, circinas, ausencia de clamidosporas) lo distinguen de otras especies en *Fusarium*, pero se incorporó al final del proyecto esta técnica por las bondades que presenta en cuanto a la rapidez y bajo costo del diagnóstico.

El hongo *Fusarium circinatum* (Nelson, Tousson y Marassas) Nirenberg y O'Donnell fue recientemente determinado en Chile en plantas de *Pinus radiata*, mantenidas como setos, en viveros de la VIII Región (Wingfield *et al.* 2001). Posteriormente el hongo ha sido determinado sobre plantas de pino radiata creciendo en "contenedores" y sobre plantas de viveros a raíz desnuda en viveros de la VII, VIII y X Regiones y en la VII y VIII Regiones, en plantaciones de la temporada recientemente establecidas.

F. circinatum es el agente causal de la enfermedad de los pinos conocida como "pitch canker" o "cancro resinoso", enfermedad que, introducida en California (McCain *et al.*, 1987), ha demostrado ser muy severa sobre *P. radiata* tanto en sus sitios de origen, como en aquellos mantenidos como ornamentales en parques y avenidas o cultivados para árbol de Pascua (Adams *et al.* 1999, Owen y Adams 1999, Storer *et al.* 1994; 1999).

Sin duda, *F.circinatum* representa la más seria amenaza para el cultivo del pino radiata en el país y se hace urgente iniciar estudios sistemáticos sobre diversos aspectos de la enfermedad, que permitan minimizar sus efectos perjudiciales y considerar algunas posibilidades de manejo.

La enfermedad, como “cancro resinoso”, no ha sido aun observada en Chile y el patógeno se mantiene presente solamente sobre plantas en setos, en viveros, tanto a raíz cubierta como raíz desnuda y en los primeros tres años de plantación. Los ataques en plantación se presume sean originados en el vivero, situación que sería similar al comportamiento de *F.circinatum* sobre *P.patula* en Sudáfrica (Viljoen y Wingfield 1994, Wingfield 1999 y Wingfield 1999, p. 102).

Las razones porque la enfermedad no haya sido observada sobre pinos adultos que crecen en la inmediata vecindad de los viveros donde el patógeno está presente, son desconocidas del todo. Tampoco se conoce como *F.circinatum* sobrevive o como se disemina en viveros.

Los estudios que se propusieron consideraron esencialmente el problema como una “fusariosis” de plantas en viveros asociada a un patógeno que se comporta como hongo de suelo, cuya dispersión a otros viveros es inevitable, aunque pueda ser retrasada, y a sitios de plantación donde causará mortalidad en los primeros años de plantación.

Las pérdidas que se asocian a la mera presencia de *F.circinatum* son irreversibles y las acciones que pudieran disminuirlas no provienen directamente de estudios de cómo ocurre la enfermedad en Chile. Donde puede y debe actuarse es en obtener conocimiento que permita minimizar las pérdidas que se producen en los programas de mejoramiento, en la producción de plantas y en las plantaciones en sus primeros años.

El proyecto tuvo como objetivo central obtener antecedentes del patógeno y de la enfermedad que permitan manejarlo y minimizar su impacto, especialmente en producción de plantas y de setos. El ámbito de los estudios propuestos es muy amplio, ya que está diseñado para obtener antecedentes básicos, simples y útiles.

Los objetivos específicos fueron:

- Conocer la diversidad genética de las poblaciones de *F. circinatum* presentes en Chile (Objetivo Específico 1).
- Obtener antecedentes sobre su patogenicidad y virulencia bajo diferentes condiciones de producción (Objetivo Específico 2).
- Diseñar una metodología para pruebas de resistencia en poblaciones de pino radiata en Chile (Objetivo Específico 3).
- Conocer sobre la supervivencia del patógeno y el movimiento y avance de la enfermedad (Objetivo Específico 4).
- Estudiar aspectos para su control (Objetivo Específico 5).
- Transferir sus resultados al sector forestal (Objetivo Específico 6).

3. PROPOSITO DEL PROYECTO

Obtener conocimiento sobre el comportamiento de *Fusarium circinatum* en el cultivo de *Pinus radiata* en Chile, aplicables al manejo de la enfermedad.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivo Específico 1. Caracterizar las poblaciones de *F. circinatum* en el país.

Los estudios planteados para resolver este objetivo se fundamentan en que un bajo número de genotipos indica introducción reciente del patógeno o ausencia de reproducción sexual (caso de California). Por el contrario, si se obtuviese un alto número de genotipos, se concluiría que el hongo lleva años de introducido (caso de Florida), o que existe reproducción sexual y recombinación (caso de Sudáfrica).

Para estimar la diversidad genética se usan técnicas de compatibilidad vegetativa. En muchos hongos filamentosos, individuos fisiológicamente distintos de la misma especie pueden fusionarse (fusión de micelio) para formar un heterocarionte. En la naturaleza, la fusión de hifas (estructura vegetativa) es extremadamente común pero no toda fusión es estable, la gran mayoría aborta después de la fusión porque no hay compatibilidad. Cuando el heterocarionte resultante de la fusión es estable, se dice que los participantes son compatibles vegetativamente y que pertenecen al mismo grupo de compatibilidad vegetativa o VCG. La compatibilidad vegetativa (o la incompatibilidad) tiene una base genética de múltiples loci.

El asunto es como hacer para que un observador pueda reconocer si un conjunto de hifas son heterocariontes, para así establecer que la fusión de hifas es estable y constituyen un VCG. El método que se usa en *Fusarium* es el de la observación de crecimiento prototrófico bajo condiciones en las que ninguno de los componentes auxotróficos (cuya fusión se observa) podría sobrevivir. Un auxotrofo es un mutante incapaz de sintetizar un componente necesario para su crecimiento, pero que reasume el crecimiento si se aporta el componente no sintetizado.

La técnica contempla primero inducir mutantes auxotrofos del hongo, los que se obtienen haciendo crecer el hongo en un medio con $KClO_3$, en este medio se producen “sectores” de micelio, o mutantes *nit*, que resisten el clorato (Figura 1), en realidad son incapaces de realizar la absorción de nitrato, presenta falla en la enzima nitrato reductasa (si absorbiesen clorato pasaría a clorito y éste es altamente tóxico). Cada “sector” obtenido es traspasado y mantenido en otro medio de cultivo.

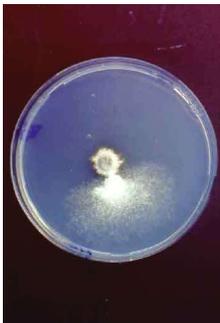


Figura 1.- Mutante *nit*. Sector de crecimiento resistente al clorato.

La segunda etapa es conocer que tipo de mutante es, es decir que fuente de nitrógeno está habilitado para usar, ya que no toman nitrato. Por lo que cada “sector mutante” aislado se prueba sobre medios que contienen nitrito, o amonio, o hipoxantina, o ac. úrico, esto permite clasificar a los mutantes según el locus donde se produjo la mutación.

En la tercera etapa, de complementación, los mutantes se porean, en todas las combinaciones posibles en un medio mínimo en nutriente donde cada mutante crece muy pobremente. Cuando en una combinación los componentes son compatibles vegetativamente, el crecimiento de cada componente (que es muy pobre) cambia notablemente a uno abundante crecimiento en la zona de fusión, perfectamente visible, y por lo tanto los componentes de la fusión pertenecen a un mismo VCG (Figura 2).



Figura 2. Estudio de complementación entre *nit* mutantes.

Los miembros de un mismo VCG tienden a mostrar un mismo comportamiento. Por ejemplo en varias formas especiales de *F. oxysporum*, hay una fuerte correlación entre patogenicidad y virulencia, pero en algunos, los menos, no existe esa correlación. Estos estudios de correlación entre VCG y patogenicidad no se han hecho para *F. circinatum* y debe considerarse a futuro en Chile.

La determinación de VCG que se obtenga puede compararse con VCG existentes en otros países e inferir sobre el origen de los tipos existentes en Chile.

Objetivo específico 2. Determinar la patogenicidad de *F. circinatum* en diferentes etapas del cultivo del pino radiata y evaluar el comportamiento de la virulencia de cepas.

Este objetivo persigue conocer la patogenicidad y la virulencia de los aislamientos de *F. circinatum* en Chile. Los estudios de patogenicidad son necesarios para reconocer si hay variaciones en la capacidad de causar enfermedad o especializaciones en las poblaciones del patógeno. Por ejemplo, los aislamientos de raíz no afectan ramas o si todas las poblaciones son capaces de atacar todo tipo u órgano de las plantas.

La virulencia es un dato que debe considerarse para validar estudios de resistencia de las poblaciones de pino.

La patogenicidad es la capacidad de producir enfermedad. Se prueba simplemente inoculando el hongo sobre el huésped. Son patógenas todas las cepas que produzcan un síntoma de la enfermedad que se estudie, no son patógenas (saprofitas) si no producen síntoma o no inducen respuesta en la planta donde se han inoculado.

La virulencia es la medida de la patogenicidad y se establece por diferentes métodos. Este concepto debe utilizarse pues es muy frecuente que para un patógeno haya aislamientos que causan síntomas incipientes y otros que producen la muerte. La virulencia se estima por varios métodos: por ejemplo, la cantidad de inóculo requerida para producir un mismo síntoma (menor cantidad mayor virulencia) o la gravedad de los síntomas para una misma cantidad de inóculo (más severidad mayor virulencia). También se considera una medida de virulencia el tiempo que transcurre en manifestarse un síntoma dado (período de incubación, a menor tiempo mayor virulencia) o el tiempo que toma en el huésped inoculado la producción de nuevo inóculo y ser capaz de infectar a otras plantas (período infeccioso: menor tiempo mayor virulencia).

En el proyecto la virulencia de los diferentes aislamientos de *F. circinatum* se estima por varios procedimientos diferentes, de modo de constatar si se produce siempre el mismo ordenamiento entre ellos (validación). Si el ordenamiento fuese diferente, se deberá considerar los resultados para el método de inoculación que se use posteriormente en otros estudios (por ejemplo, si en inoculación por aspersión el más virulento es A, en esas pruebas se usará A, si en inoculación en tallo, es D, en esas inoculaciones se usará D).

La patogenicidad se estudia en prácticamente todas las situaciones de producción de plantas. Esto se realiza así porque se estima fundamental conocer si un mismo aislamiento (como hongo de suelo o sustrato) puede producir enfermedad en vivero a raíz desnuda o cubierta, si puede producir ataques tempranos (damping off) o posteriores a la poda de raíces en un vivero, o si, como hongo aéreo, puede atacar plantas de más de 12 meses preparadas para seto o, en terreno, a plantas de más de 4 años.

Objetivo específico 3.- Establecer una metodología para evaluación de resistencia a *Fusarium circinatum* en las poblaciones de *P. radiata* de Chile.

Este objetivo pretende establecer una metodología de trabajo para realizar pruebas de resistencia.

Contempla estudios sobre edad de plantas a inocular, eficacia de métodos de inoculación y diseño de pruebas posteriores. Se asume que deberá probarse necesariamente, en algún momento, que es lo que pasa en árboles adultos y qué significa un árbol resistente, o a que es resistente.

El proyecto, en esta etapa, solamente pretende dejar disponible un procedimiento para realizar posteriormente pruebas masivas del material proveniente de los programas de mejoramiento genético.

Objetivo específico 4.- Obtener antecedentes sobre patogénesis, saprogenesis y epidemiología de la enfermedad en setos y viveros de *Pinus radiata*.

En este objetivo se estudia el efecto de factores del medio sobre la enfermedad (temperatura y humedad), aspectos de sobrevivencia del hongo, de su avance en tiempo y espacio, y su asociación con otros patógenos e insectos.

La sobrevivencia del hongo en el suelo, sustrato de corteza y contenedores entregará antecedentes que podrán permitir planificar el tiempo que debe mantenerse, los cuarteles de un vivero, con el suelo o sustrato libre de pino o la necesidad de esterilizar el sustrato y contenedores.

El papel que pueden tener las plantas muertas o enfermas, sin síntomas, por *F. circinatum* en la dispersión del hongo, permitirá saber la necesidad o no de eliminar las plantas muertas de una plantación y determinar la posibilidad de dispersión del hongo por plantas asintomáticas.

Se estudia aspectos de la epidemiología de *F. circinatum* como: avance de la enfermedad en el espacio y en el tiempo en un jardín de setos, así como el avance de la presencia de inóculo. También se estudia la distribución de la enfermedad en plantaciones, la asociación con otros patógenos y con insectos, como polilla del brote y escolítos.

Finalmente se estudia la presencia de inóculo en el aire, tanto en setos como en invernaderos.

Objetivo específico 5.- Probar medidas de control de la “fusariosis” en viveros y setos de *Pinus radiata*.

En este objetivo se incluye estudios de control de *F. circinatum* posibles de aplicar en sistemas de producción de plantas. Contempla estudios de control químico, de control cultural y control biológico.

Los estudios de control químico se inician primero con pruebas *in vitro* para determinar eficacia relativa de esos fungicidas. La etapa siguiente en el escrutinio de fungicidas, es probar las concentraciones mínimas en el suelo que se requieren para alcanzar un determinado porcentaje de control de damping off o de infecciones tardías. En una tercera etapa se deberá ajustar las dosis a sistemas comerciales de aplicación para obtener el control esperado. Todos los estudios de control químico se realizan bajo condiciones de invernadero, y determina su efecto sobre el sustrato y la desinfección de contenedores. Los estudios de eficacia de control en terreno se deberán realizar posteriormente, por razones de bioseguridad, hasta no tener más antecedentes básicos de *F. circinatum*.

Se estudia el efecto de cultivos intercalares, de la fertilización y de enmiendas orgánicas sobre *F. circinatum*.

Los estudios de control biológico contempla solamente las etapas de aislamientos de organismos desde rizosfera o rizoplano y pruebas *in vitro*. Dentro de la duración del proyecto no está contemplado llegar a realizar pruebas de terreno.

Objetivo específico 6.- Transferir los resultados al sector forestal y capacitar al personal técnico en manejo de la enfermedad

En este objetivo se plantea traspasar la información que se vaya obteniendo sobre prácticas de manejo y de control principalmente a los viveristas forestales.

5. ZONA GEOGRÁFICA DE EJECUCIÓN

Los trabajos se realizaron en las zonas de detección de *Fusarium circinatum* en la VII y VIII Región, especialmente en viveros de *Pinus radiata*.

También se incorporaron prospecciones para determinar la presencia o no de *F. circinatum* en la IX y X Región.

6. FECHA DE INICIO Y DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA DE INICIO	Noviembre 2003
FECHA DE TERMINO	Abril 2007
DURACIÓN DEL PROYECTO	42 meses

7. PROPOSITO Y JERARQUIA DE OBJETIVOS DEL PROYECTO

ÍTEM	DESCRIPCIÓN
FIN	Manejar la enfermedad producida por <i>F. circinatum</i> en vivero y jardín de setos para disminuir las pérdidas a niveles económicamente sustentables y evitar la dispersión del hongo a plantaciones.
PROPÓSITO	Obtener conocimiento sobre el comportamiento de <i>Fusarium circinatum</i> en el cultivo de <i>Pinus radiata</i> en Chile, aplicables al manejo de la enfermedad.
RESULTADOS O METAS	<ol style="list-style-type: none">1. Caracterizar las poblaciones de <i>F. circinatum</i> en el país.2. Determinar la patogenicidad de <i>F. circinatum</i> en diferentes etapas del cultivo del <i>Pinus radiata</i> y evaluar el comportamiento de la virulencia de cepas.3. Establecer una metodología para evaluación de resistencia a <i>Fusarium circinatum</i> en las poblaciones de <i>P. radiata</i> de Chile.4. Obtener antecedentes sobre patogénesis, saprogénesis y epidemiología de la enfermedad en setos y viveros de <i>Pinus radiata</i>.5. Probar medidas de control de la “fusariosis” en viveros y setos de <i>Pinus radiata</i>.6. Transferir los resultados al sector forestal y capacitar al personal técnico en manejo de la enfermedad.
ACTIVIDADES	META 1 1. Caracterizar las poblaciones de <i>F. circinatum</i> en el país. 1.1. Formación de una colección de aislamientos de <i>F. circinatum</i> en Chile. 1.2. Determinación de la diversidad de la población de <i>F. circinatum</i> en Chile por grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). 1.3. Implementación de la técnica de diagnóstico de <i>F. circinatum</i> por PCR. META 2 2.1. Virulencia de cepas de <i>F. circinatum</i> presentes en Chile. 2.1.1. Efecto de la concentración del inóculo de <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P.radiata</i> . 2.1.2. Severidad de los síntomas producidos por <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P.radiata</i> .

ÍTEM	DESCRIPCIÓN
	<p>2.1.3. Período incubación de <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P. radiata</i>.</p> <p>2.1.4. Período de latencia de <i>F. circinatum</i> en plantas de <i>P. radiata</i>.</p> <p>2.2. Estudios de patogenicidad de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>2.2.1. <i>F. circinatum</i> como causante de damping off.</p> <p>2.2.1.a. Inoculación de semillas de <i>P. radiata</i> con <i>F. circinatum</i> bajo condiciones de invernadero.</p> <p>2.2.1.b. Inoculación de semillas de <i>P. radiata</i> con <i>F. circinatum</i> bajo condiciones de microparcels.</p> <p>2.2.1.c. Inoculación del suelo con <i>F. circinatum</i> bajo condiciones de invernadero.</p> <p>2.2.2. Patogenicidad de <i>F. circinatum</i> en vivero con producción de plantas a raíz desnuda.</p> <p>2.2.2.a. Inoculación retrasada del suelo con <i>F. circinatum</i> en bandejas.</p> <p>2.2.2.b. Inoculación retrasada del suelo con <i>F. circinatum</i> en microparcels.</p> <p>2.2.2.c. Efecto del trasplante de plantas sanas de <i>P. radiata</i> a suelo inoculado con <i>Fusarium circinatum</i>.</p> <p>2.2.3. Patogenicidad de <i>F. circinatum</i> en vivero con producción de planta de <i>Pinus radiata</i> a raíz cubierta.</p> <p>2.2.3.a. Inoculación de semillas de <i>P. radiata</i> con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>2.2.3.b. Inoculación del sustrato con <i>F. circinatum</i> en tubete.</p> <p>2.2.4. Infección tardía de plantas de <i>P. radiata</i> con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>2.2.5. Inoculación de plantas de <i>P. radiata</i> mayores de 4 años con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>2.2.5.a. Ensayo preliminar de inoculación de plantas de <i>P. radiata</i> mayores de 4 años con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>2.2.5.b. Ensayo de corroboración de un sistema de inoculación de <i>P. radiata</i> mayor a 4 años con <i>F. circinatum</i> (Ensayo Suspendido – Plaga de Control Obligatorio).</p> <p>META 3</p> <p>3. Establecer una metodología para la evaluación de resistencia a <i>F. circinatum</i>.</p> <p>3.1. Determinación de efecto de la edad en respuesta a la inoculación.</p> <p>3.2. Prueba de métodos de inoculación.</p> <p>3.3. Prueba de estabilidad del material.</p> <p>META 4</p> <p>4.1. Patogénesis de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.1.1. Efecto de la temperatura en la ocurrencia de la enfermedad.</p> <p>4.1.2. Efecto del contenido de humedad de suelo en la ocurrencia de la enfermedad.</p> <p>4.1.2.a. La humedad como factor de predisposición a la enfermedad.</p> <p>4.1.2.b. Efecto de la humedad del suelo sobre el desarrollo de la enfermedad.</p> <p>4.2. Saprogénesis de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.1. Duración del inóculo de <i>F. circinatum</i> en el suelo.</p> <p>4.2.1.a. Duración del inóculo de <i>F. circinatum</i> en suelo natural.</p> <p>4.2.1.b. Duración del inóculo de <i>F. circinatum</i> en el suelo con materia orgánica reducida.</p> <p>4.2.2.c. Capacidad de <i>F. circinatum</i> para colonizar sustrato de corteza de pino.</p> <p>4.2.2. Rol del sustrato de corteza en la sobrevivencia de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.2.a. Sobrevivencia de <i>F. circinatum</i> sobre sustrato artificialmente inoculado.</p> <p>4.2.2.b. Colonización de partículas de sustrato artificialmente inoculado con <i>Fusarium circinatum</i>.</p> <p>4.2.3. Rol de contenedores en permanencia del inóculo de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.3.a. Rol de contenedores como fuente de inóculo primario de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.3.b. Sobrevivencia del inóculo de <i>F. circinatum</i> sobre la bandeja o tubete.</p> <p>4.2.3.c. Determinación del tipo de inóculo de <i>F. circinatum</i> presente en la bandeja o</p>

ÍTEM	DESCRIPCIÓN
	<p>tubete.</p> <p>4.2.4. Rol de las plantas muertas de <i>P. radiata</i> en vivero o plantación.</p> <p>4.2.4.a. Determinación de extensión de la colonización de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.4.b. Determinación de la duración de la colonización de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.2.4.b.1 Supervivencia de <i>F. circinatum</i> sobre plantas con más de un año del ataque y posibilidad que ese material sirva de inóculo.</p> <p>4.3. Epidemiología de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.1. Presencia de <i>F. circinatum</i> sobre brotes en plantas de jardín de setos.</p> <p>4.3.2. Distribución de la enfermedad en el jardín de setos.</p> <p>4.3.3. Avance de la enfermedad en jardín de setos establecido a raíz desnuda.</p> <p>4.3.4. Distribución del inóculo de <i>F. circinatum</i> en jardín de setos.</p> <p>4.3.5. Distribución del problema en plantaciones de <i>P. radiata</i> con determinación positiva.</p> <p>4.3.5.a. Distribución ataque <i>F. circinatum</i> en plantación de 4 años.</p> <p>4.3.6. Asociación de <i>F. circinatum</i> con otros patógenos.</p> <p>4.3.6.a. Asociación con otros patógenos. Inoculación al suelo.</p> <p>4.3.6.b. Asociación con otros patógenos. Inoculación al cuello.</p> <p>4.3.7. Rol insectos en la presencia de la enfermedad.</p> <p>4.3.7.a. Rol de <i>Rhyacionia buoliana</i>.</p> <p>4.3.7.a.1. Implante de larvas de <i>R. buoliana</i> inoculadas con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.7.a.2. Implante de larvas de <i>R. buoliana</i> en brote inoculados con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.7.a.3. Determinación de <i>F. circinatum</i> sobre de brotes de pino muertos por ataques de <i>R. buoliana</i>.</p> <p>4.3.7.b. Rol de los Escolítidos.</p> <p>4.3.7.b.1. Presencia de <i>F. circinatum</i> sobre escolítidos.</p> <p>4.3.7.b.2. Inoculación de escolítidos con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.8. Rol de las plantas de <i>P. radiata</i> sintomáticas en terreno.</p> <p>4.3.8.a. Plantación dirigida de <i>P. radiata</i>.</p> <p>4.3.8.b. Prospección de <i>F. circinatum</i> en plantación normal.</p> <p>4.3.8.c. Replantación en lugares donde existió una planta infestada con <i>F. circinatum</i></p> <p>4.3.9. Presencia de inóculo de <i>F. circinatum</i> en el ambiente.</p> <p>4.3.9.a. Determinación de esporas de <i>F. circinatum</i> en el aire.</p> <p>4.3.9.a.1 Tiempo mínimo de muestreo del aire en espacios cerrados para determinar presencia de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.9.a.2 Determinación de inóculo en ambientes abiertos, plantaciones o vivero usando trampa de esporas y PCR.</p> <p>4.3.9.b. Determinación de esporas de <i>F. circinatum</i> en agua de riego escurrida.</p> <p>4.3.10. Determinación de ocurrencia de cancro resinoso en estacas de <i>P. radiata</i> a raíz desnuda.</p> <p>4.3.10.a Ocurrencia de infección en estacas de <i>P. radiata</i> a raíz desnuda.</p> <p>4.3.11. Revisión de plantaciones de <i>P. radiata</i> vecinas a puntos con infestación conocida de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.12. Efecto de la poda de raíces en la infestación de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>4.3.13. Comportamiento sobre madera.</p> <p>META 5</p> <p>5.1. Control químico.</p> <p>5.1.1. Selección de productos para el control de <i>F. circinatum in vitro</i>.</p> <p>5.1.2. Control con fungicidas de damping off provocado por <i>F. circinatum</i>.</p> <p>5.1.3. Fungicida en suelo para control de infecciones tardías de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>5.1.4. Sanitización: uso de desinfectantes de contenedores, sustratos y otros.</p>

ÍTEM	DESCRIPCIÓN
	<p>5.2. Control Cultural.</p> <p>5.2.1. Cultivo intercalar.</p> <p>5.2.2. Rol de fertilizantes en la incidencia de la enfermedad.</p> <p>5.2.2.a. Efecto de dosis creciente de nitrógeno en plantas inoculadas (tallo y ápice) con <i>F. circinatum</i>.</p> <p>5.2.2.b. Efecto de N, P, K y B en plantas inoculadas con <i>F. circinatum</i> en la severidad de la enfermedad.</p> <p>5.2.2.c. Efecto de la deficiencia nutricional asociadas a severidad de la enfermedad.</p> <p>5.2.3. Efecto de enmiendas orgánicas sobre la enfermedad en invernadero.</p> <p>5.3. Control biológico de <i>F. circinatum</i>.</p> <p>5.3.a Prueba de antagonistas en invernadero.</p> <p>META 6</p> <p>6.1. Seminarios a viveristas.</p> <p>6.2. Documentos de divulgación.</p> <p>6.3. Informes de avance.</p> <p>6.4. Informe final.</p>

8. ESTUDIOS Y RESULTADOS

4.1. NOMBRE DE LA META.

META 1

1. Caracterizar las poblaciones de *F. circinatum* en el país.

4.1.1. NOMBRE DEL ENSAYO.

1.1. Formación de una colección de aislamientos de *F. circinatum* en Chile

4.1.2. AVANCE A LA FECHA

Introducción.

La idea básica de esta proposición era mantener en un solo lugar una colección de los aislamientos de *F. circinatum* obtenidos en el país.

La idea original de mantener una posible colección de aislamientos en laboratorios del proyecto debió desecharse por la transitoriedad de éste. Por otra parte, el alto número de aislamientos en algunos laboratorios dificultaba la mantención de una colección en un laboratorio diferente al que la había obtenido.

Inicialmente, debió obtenerse autorización del Servicio Agrícola y Ganadero para realizar aislamientos y mantención de Ceparios de *Fusarium circinatum* según lo establece la Resolución Exenta N° 1.742 del 8 de julio de 2003. En los permisos obtenidos, se consideró dos modos para mantener las colecciones de los aislamientos que se fueran obteniendo en los laboratorios autorizados para ello:

- a). Medio líquido (ADE)
- b). Sobre de papel filtro.

En un comienzo se consideró el medio líquido como más apropiado por su simpleza (agua destilada con o sin aditivos), pero el conocimiento de que se tendría sobre 300 aislamientos para la colección, al incorporar material aislado por SAG y Bioforest S.A., implica llegar a mantener una colección sobre 1.500 tubos, debido a que se debe considerar las repeticiones para cada aislamiento. Por la razón anterior, es que cobró prioridad la comparación entre mantención en ADE y papel filtro estéril, ya que este último método permitiría almacenar gran cantidad de aislamientos en menos espacio.

Evaluaciones efectuadas en febrero de 2005 (Tercer Informe trimestral) consideraban que el proyecto empadrona los aislamientos existentes en otros laboratorios, con una periodicidad anual, en el mes de abril, y reciba copias de algunos aislamientos para estudios, como VCG u otros.

Los resultados obtenidos en pruebas realizadas indican que es posible mantener los aislamientos en papel filtro esterilizado y secado posteriormente en cápsula Petri en desecador o en cámara de flujo. El procedimiento es el siguiente:

1. Discos de papel filtro (7,09 cm de diámetro) son esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121° C.
2. Los discos esterilizados de papel filtro se colocan con pinzas esterilizadas sobre el medio (PDA) en discos Petri; la humedad del medio satura el papel (Idealmente usar discos de Petri a 48 horas de llenado).
3. Colocar un trocito del cultivo a preservar sobre y en el centro del disco de papel.
4. Incubar a 23-25°C con períodos alternativos de luz y oscuridad de 12 horas durante 6-8 días.
5. Levantar el disco de papel con pinzas esterilizadas y traspasar a disco de Petri esterilizado y vacío. No sellar el disco con parafilm.
6. Colocar el disco de Petri en desecador por 48 horas o mantener en cámara de flujo laminar en funcionamiento. Usualmente el papel filtro suele enrollarse o curvarse al secarse.
7. Esterilizar “viales” con tapa atornillada o tapón sellado de goma, en autoclave.
8. Cortar el disco seco de papel en segmentos de 5 x 5 mm y colocarlos en vial con tapa.
9. Guardar en refrigerador a 3-4°C.
10. Para usar, sacar en cámara de flujo un trozo de papel y colocar en medio de cultivo.

Aislamientos de *F. circinatum* traspasados a papel han mantenido su viabilidad hasta por 15 meses.

Otros métodos de preservación como en silica gel o suelo, aunque no excesivamente caros (como liofilización o nitrógeno líquido) han sido desechados porque ocupan más espacio que el papel o simplemente los tubos con agua destilada estéril.

Como habían dificultades para mantener una colección mayor a 200 aislamientos, se recomendó que cada laboratorio mantenga sus propias colecciones (SAG Lo Aguirre, SAG Chillán, SAG Osorno, BIOFOREST y U. de Concepción), por el procedimiento que estime conveniente y envíe los aislamientos que se le soliciten al laboratorio del proyecto. Lo anteriormente expuesto fue ratificado por el Comité Técnico del proyecto, el día 16 de mayo de 2005, así cada cepario de *F.circinatum* será mantenido por cada institución autorizada por el SAG, por lo cual no se enviarían las cepas para su mantención en el cepario central del proyecto, como estaba establecido en un principio.

En cuanto a mantener un sistema de codificación único se propone un sistema de 2 letras y 7 dígitos:

Posición 1-2: numérico que codifica el laboratorio donde se mantiene el cepario.

- 01.- SAG Lo Aguirre.
- 02.- SAG Chillán.
- 03.- SAG Temuco.
- 04.- SAG Osorno.
- 05.- Universidad de Concepción.
- 06.- Bioforest.

Posición 3-4: alfabético que codifica la especie.

FC.- *Fusarium circinatum*.

Posición 5: numérico que codifica la procedencia de la muestra.

- 1.- vivero, planta raíz desnuda.
- 2.- vivero, planta raíz cubierta.
- 3.- setos.
- 4.- plantación.

Posición 6: numérico que codifica el órgano de la planta.

- 1.- raíz.
- 2.- cuello.
- 3.- ramas.
- 4.- tallo.
- 5.- ápices.
- 6.- conos.
- 7.- estróbilos.

Posición 7, 8 y 9: numérico que representa el correlativo en la colección de cada laboratorio.

001.- primer aislamiento.

El código sería de esta forma: 01-FC-32001 (aislamiento mantenido en SAG de Lo Aguirre de la especie *Fusarium circinatum* aislado de seto del cuello de una planta y es el primer aislado de la colección).

4.2. NOMBRE DE LA META.

META 1

1. Caracterizar las poblaciones de *F. circinatum* en el país.

4.2.1. NOMBRE DEL ENSAYO.

1.2. Determinación de la diversidad de la población de *F. circinatum* en Chile por grupos de compatibilidad vegetativa (VCG).

4.2.2. AVANCE A LA FECHA

Introducción

La determinación de VCG en una especie en un lugar, permite considerar cuan variable es esta población. En Sudáfrica (Viljoen *et al.* 1997) determinaron 23 grupos de compatibilidad vegetativa, indicando alta variabilidad genotípica en la población de *F. circinatum*. Gordon *et al.* (2001) indican 5 VGC para California desde 209 aislamientos. La población de *F. circinatum* en Florida es de 47 VCG desde 117 aislamientos (Correl *et al.*, 1992).

Metodología

Se siguió en todo la metodología propuesta por Correll *et al.* (1987).

Se utilizaron 21 aislamientos (8 aislamientos SAG Chillán y 13 U. de C.) provenientes de cultivos monospóricos, los que se mantuvieron en medio completo (Correll *et al.* 1987). Un trozo pequeño de cultivo se traspasó a medio clorato 1,5% para inducir mutantes *nit*. Los mutantes *nit* fueron mantenidos en medio mínimo y luego caracterizados fenotípicamente como mutantes *nit1*, *nit3* o NitM, según su capacidad para utilizar nitrito o hipaxantina como única fuente de nitrógeno (Correll *et al.* 1987).

La etapa siguiente es el apareo entre mutantes de diferentes clases fenotípicas para determinar su compatibilidad vegetativa, que se hizo en discos de Petri incubados bajo luz a 25°C.

Se considera que hay compatibilidad entre los pares de mutantes cuando aparece una clara línea de micelio prototrófico en la zona de contacto de ambos mutantes.

Resultados

No se obtuvo resultados positivos en ninguna de las cuatro veces que se realizó este estudio. En todas las oportunidades los mutantes o pertenecieron a una sola clase fenotípica (repetición 1, 2 y 3) o revertían al tipo original en los diferentes pasos del estudio (repetición 4).

Se presentan los resultados de la última repetición de la determinación de VCG, noviembre 2006-abril 2007.

Se trabajó con los siguientes aislamientos (Tabla 1.2-1) de los cuales se obtuvo 117 mutantes desde 12 cepas en medio clorato; 9 cepas no originaron mutantes.

En la siguiente etapa, 51 mutantes revirtieron al tipo original cuando fueron colocadas en medio mínimo. El estudio se continuó con 66 mutantes que se anotan en Tabla 1.2-1.

En la etapa de clasificación fenotípica revierten, en los diferentes medios 36 mutantes, por lo que solamente se logró obtener 26 fenotipos *nit3*, 2 fenotipos *nit1* y 2 fenotipos NitM.

Sin embargo, en la etapa final de apareamiento revirtieron todos al tipo original.

No se tiene explicación para estos hechos.

Tabla 1.2-1. Aislamientos y mutantes obtenidos en la 4^a repetición del estudio de VCG.

Aislamiento	Medio clorato	Medio mínimo
3229 SAG	Mutante	Revierte
3551 SAG	No	
3220 SAG	No	
3035 SAG	Mutante	2
3512 SAG	No	
3549 SAG	Mutante	2
2993 SAG	No	
3000 SAG	Mutante	2
6297	No	
6522	No	
4641	Mutante	3
HM	Mutante	1
PPH	Mutante	18
GIR4	Mutante	8
CNVCD	No	
LLPT	Mutante	13
S06CD	Mutante	17
Álamo	Mutante	Revierte
QC01	No	
PTCR	No	
CDS06-1	Mutante	Revierte
	12 cepas mutaron	

4.3. NOMBRE DE LA META.

META 1

1. Caracterizar las poblaciones de *F. circinatum* en el país.

4.3.1. NOMBRE DEL ENSAYO.

1.3. Implementación de la técnica de diagnóstico de *F. circinatum* por PCR

4.3.2. AVANCE A LA FECHA

La implementación de esta técnica dentro del proyecto fue aprobada el segundo semestre de 2006 para ser establecida físicamente en el laboratorio de patología del SAG de Chillán y traspasada por Bioforest S.A.

La adquisición de los equipos, reactivos y la adaptación del laboratorio de patología del SAG fue terminada a fines del año 2006, momento en el cual se comenzó a conocer e implementar la técnica de PCR para la identificación de *F. circinatum* basada en la tesis realizada Almuth Hammerbacher para optar al grado académico de Magíster en Ciencias de la Facultad de Agricultura y Ciencias Naturales del Departamento de Microbiología y Patologías de plantas de la Universidad de Pretoria, Sudáfrica.

El fundamento de este protocolo se basa en ADN extraído y amplificado desde micelio desarrollado en medios de cultivo no necesariamente selectivos y no monosporicos, razón por la cual el diagnóstico es más rápido.

Fueron evaluadas por método PCR 7 cepas identificadas como *F.circinatum*, cuatro cepas obtenidas de aislamientos desde suelo y aire que se tenía duda que correspondieran a *F.circinatum*, una cepa de *Fusarium* que no correspondía a *F. circinatum*, además se realizó PCR a una muestra correspondiente a lavado con Buffer TE de papel filtro expuesto en placas con medio selectivo y a una solución de esporas que se mantenía, en frío (4°C) y que correspondía a mezcla de cepas 4641, 6297, 6522 y Alamo (Tabla 1.3-1).

Resultados.

Al aplicar el protocolo PCR en una primera etapa se obtuvieron resultados negativos, probablemente por baja cantidad de MgCl₂, por lo tanto, se realizó repetición del protocolo, sin embargo, por razones de tiempo no se corrió completamente la electroforésis, obteniéndose los resultados que se indican en la Tabla 1.3-1 y Figura 1.3-1. Los resultados no son concluyentes, ya que las bandas no corren junto al marcador (Figura 1.3-1), excepto bandas 6 y 10, por lo tanto no se tiene certeza que las otras bandas correspondan a *F. circinatum*, según el análisis PCR-CIRC. Tres muestras fueron negativas a *F. circinatum*, y que correspondían a cepas que se tenía duda sobre su identificación. El cultivo que se tenía identificado como una especie diferente de *F.circinatum*, dió positivo en el protocolo PCR probablemente por contaminación del cultivo, por identificación incorrecta mediante taxonomía tradicional o por inconvenientes durante la aplicación del protocolo PCR-CIRC.

Tabla 1.3-1. Detección de *F. circinatum* en placas expuestas con papel filtro durante 6,5 hrs.

Banda	Código muestra	Resultado
1	LPPT	+
2	4641	+
3	6522	+
4	SNVCD	+
5	PPH	+
6	Suelo A12	+
7	Aire S1M2	-
8	Suelo M12	-
9	Suelo A18	-
10	6297	+
11	<i>Fusarium</i> sp	+
12	Lavado de papel filtro	+
13	HM	+
14	Solución esporas	+

Los resultados indican que el empleo de papel filtro y posterior cultivo o aplicación de PCR con primers específicos para *F.circinatum* podrían detectar la presencia del inóculo en el ambiente,

pero solamente el cultivo permite cuantificar la cantidad de inóculo, ya que para poder realizar la cuantificación propuesta por Schweigkoffler *et al.* (2004) es necesario realizar PCR en tiempo real.



Figura 1.3-1. Resultados protocolo PCR aplicados a diferentes muestras de hongos, banda 13 corresponde a lavado de esporas con Buffer TE desde papel filtro.

Literatura consultada

Schweigkoffler, W., O'Donnell, K y Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using real time PCR approach combined with simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3512-3520

A la fecha el Laboratorio de Patologías de SAG Chillán a analizado alrededor de 150 muestras, demostrándose la eficiencia de la técnica, tanto en su certeza como en la disminución de los tiempos de diagnóstico de 20 días actuales a poder llegar a dar una respuesta en un tiempo no superior a 12 días.

Debe hacerse notar que ésta es una técnica en que se debe realizar en forma metódica y cuidando todos sus detalles, desde los equipos usados hasta la calidad de los reactivos, ya que impurezas en los reactivos o mal funcionamiento de los equipos dan un resultado erróneo, y es por esta razón que se trabaja normalmente realizando muestras con patrones positivos y negativos.

Actualmente la técnica de PCR para la identificación de *F.circinatum* que se ha implementado en el Laboratorio de SAG Chillán está en condiciones de ser certificada para su uso como una técnica de diagnóstico rutinario.

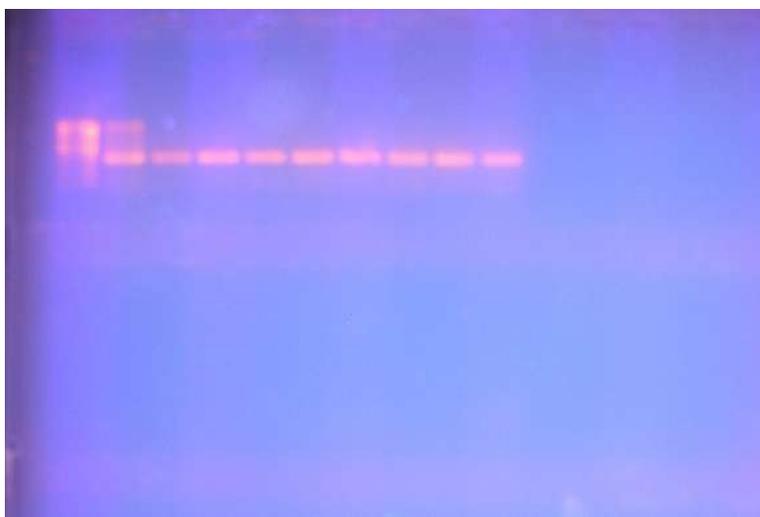


Figura 1.3-2. Resultados protocolo PCR realizado por el Laboratorio de SAG Chillán. Bandas amplificadas corresponden a un diagnostico positivo a *F.circinatum*.

4.4. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.1. Virulencia de cepas de *F. circinatum* presentes en Chile.

4.4.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.1.1. Efecto de la concentración de inóculo de *F. circinatum* en plantas de *P. radiata*.

4.4.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La virulencia de un patógeno es una medida de su patogenicidad o de su capacidad para producir enfermedad y puede ser diferente entre las diferentes cepas o “strains” de un hongo (Cooper, s.a.). Dwinell (1978) en estudios de patogenicidad de diferentes cepas de *F.circinatum*, aisladas de diversas especies de pinos, sobre *P. virginiana* y *P. taeda*, señala que hay considerable variación en la virulencia de aislamientos individuales pero que tal variación no está asociada al origen de los aislamientos. Otras investigaciones de Barrows-Broadus y Dwinell (1979, 1985) confirman esta información. Correll *et al.* (1991) realizaron pruebas de patogenicidad de 167 cepas de *F.circinatum* aisladas desde pinos, especialmente pino radiata, en California, de insectos y de aire, señala que todas fueron patógenas a pino radiata según los criterios de evaluación aplicados, sin indicar variación en virulencia. Guerra Santos (1999) indica que no hay variación en virulencia de 14 cepas de *F.circinatum* probadas sobre 12 especies de pino. Gordon *et al.* (1999) en trabajos de inoculación para observar resistencia en pino radiata indica que cepas representativas de las poblaciones de *F.circinatum* en California podían agruparse en dos grupos por su virulencia. Wingfield (1999a) menciona que existe la información sobre escasa variación en la virulencia de aislamientos de *F.circinatum* en California para comentar que biológicamente no debería existir tal uniformidad en la virulencia (Wingfield 1999b). Friel y Gordon (2002) muestran resultados de virulencia de 22 cepas de *F.circinatum* evaluados según el tamaño de las lesiones en ramas de pino radiata y usadas en pruebas para determinar su tolerancia a volátiles del pino. En términos generales, los trabajo de

Correll *et al.* (1991) y el de Friel y Gordon (2002) son los que desarrollan procedimientos que permitan comparar virulencia, evaluando de diferentes modos los síntomas producidos en las plantas inoculadas, y no constituyen meros trabajos de patogenicidad.

En este estudio se determinará virulencia de cinco cepas de *F.circinatum* en tres concentraciones cada una, sobre plantines de pino radiata y evaluadas por incidencia y severidad de la necrosis producida.

Material y método

Las cepas utilizadas en el estudio fueron las números 4641, 6297 y 6522, obtenidas desde plantas madre en bolsa producidas en Bioforest que mostraban canchales y marchitamiento; cepa Álamo, obtenida desde planta producida en bandejas en vivero de Forestal El Álamo, Parral, que mostraba enrojecimiento de acículas, y la cepa CDP obtenida desde setos con clorosis y marchitamiento en el vivero Carlos Douglas, de Forestal Mininco S.A., Yumbel. Cada cepa fue probada en concentraciones de 1×10^3 , 1×10^4 y 1×10^5 conidias ml^{-1} .

Las plantas usadas para las pruebas correspondían a las familias PC0032, MP0003 y CR0025, de Forestal Mininco S.A. y fueron producidas en tubetes con corteza de pino, en el invernadero de la Controladora de Plagas Forestales en Los Ángeles. Las plantas se inocularon a las 27 semanas de edad.

La inoculación se realizó decapitando las plantas y colocando una gota (5 μL) de la suspensión de esporas sobre el corte. El número de plantas inoculadas para cada combinación familia, cepa y concentración fue de 20 plantines. En el estudio se considero un tratamiento testigo inoculado con agua destilada esterilizada.

El efecto de los tratamientos se evaluó por incidencia (porcentaje de plantas con síntomas) y severidad, que se expresó como el porcentaje de tallo necrosado con respecto a la longitud del tallo de la planta. Se realizó dos evaluaciones, cada una sobre diez plantas, una a las cinco semanas y otra a las ocho semanas desde la inoculación. En cada evaluación las plantas fueron cortadas a nivel del substrato, traspasadas a bolsa de papel y llevadas al laboratorio del proyecto (Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales) donde se realizó las mediciones y los re-aislamientos.

Los datos de porcentaje obtenidos fueron transformados (Grados Bliss) para el análisis estadístico y para separación de medias se uso la prueba de Tukey.

Resultados

Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a las 3 semanas desde la inoculación como decoloración ligeramente parda del tallo, sin compromiso de las acículas. La necrosis se hizo evidente en las acículas y tallo en la semana 4.

Los resultados de incidencia del ataque a las 5 y 8 semanas se presentan para cada combinación de cepa y concentración en la Tabla 2.1.1-1 y como promedio por cepa en la Tabla 2.1.1-2.

Tabla 2.1.1-1. Incidencia a 5 y 8 semanas del ataque de diferentes cepas de *F.circinatum* sobre plantas pino de tres diferentes familias.

Cepa	Inóculo (Concentración)	Plantas con necrosis (%)					
		Fam. PC0032		Fam.MP0003		Fam.CR0025	
		5 sem.	8 sem.	5 sem.	8 sem.	5 sem.	8 sem.
4641	1*10 ³	80	80	60	90	60	90
4641	1*10 ⁴	80	90	80	100	80	90
4641	1*10 ⁵	80	90	100	100	100	90
6297	1*10 ³	0	0	0	10	10	0
6297	1*10 ⁴	0	40	10	0	0	0
6297	1*10 ⁵	20	10	30	0	0	10
6522	1*10 ³	50	100	90	90	70	50
6522	1*10 ⁴	100	90	100	100	100	80
6522	1*10 ⁵	100	100	100	100	100	100
Álamo	1*10 ³	0	10	10	0	0	0
Álamo	1*10 ⁴	0	10	0	0	0	0
Álamo	1*10 ⁵	10	10	0	10	0	0
CDP	1*10 ³	100	100	70	90	90	90
CDP	1*10 ⁴	80	100	100	70	40	80
CDP	1*10 ⁵	100	100	100	90	100	90
Total		0	0	0	0	0	0

La incidencia varía a las 5 semanas entre 0, todas las plantas inoculadas sanas, y 100% pero sin que ocurra interacción entre tratamientos de inoculación y familias. A las 8 semanas se mantiene este resultado.

Tabla 2.1.1-2. Incidencia promedio por cepa de ataque de *F.circinatum* en tres familias de pino radiata.

Cepa	Incidencia promedio (%)		
	Fam. PC0032	Fam. MP0003	Fam. CR0025
4141	83,3	88,3	85,0
6297	11,6	8,3	3,3
6522	90,0	96,6	83,3
Álamo	5,0	3,3	0,0
CDP	96,6	86,6	81,6

Las cepas 6297 y Álamo ocasionan escasa enfermedad y son claramente diferentes de las cepas 4641, 6522 y CDP que enferman sobre el 80% de las plantas inoculadas.

La severidad de la enfermedad evaluada a las 5 semanas se presenta separadamente para cada familia en las Tablas 2.1.1-3, 2.1.1-4 y 2.1.1-5.

Tabla 2.1.1-3. Familia PC0032: severidad de la enfermedad a 5 semanas de la inoculación.

Cepa	Inóculo (Concentración)	Severidad (%) *
------	----------------------------	-----------------

Álamo	1*10 ³	2,248	a
Testigo	1*10 ³	2,310	a
6297	1*10 ⁴	2,445	a
6297	1*10 ³	2,569	a
Álamo	1*10 ⁴	2,819	a
Álamo	1*10 ⁵	4,005	ab
6297	1*10 ⁵	4,056	ab
6522	1*10 ³	13,955	abcd
4641	1*10 ³	15,411	abcd
CDP	1*10 ⁴	19,973	bcde
4641	1*10 ⁵	23,292	cde
4641	1*10 ⁴	25,694	de
CDP	1*10 ³	27,752	def
6522	1*10 ⁴	31,702	def
6522	1*10 ⁵	34,082	ef
CDP	1*10 ⁵	43,933	f

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

La necrosis del tallo ocurrida en el tratamiento testigo no inoculado con conidias de *F.circinatum*, corresponde a oxidación de fenoles como respuesta al corte de los ápices de las plantas, y debería considerarse como criterio de ocurrencia de enfermedad cualquier lesión que alcanzara el doble de la necrosis en el testigo. De este modo las cepas Álamo y 6297 no serían virulentas. Las cepas virulentas presentan diferentes comportamientos según la concentración aplicada. La cepa 6522 presenta una respuesta lineal de modo que la severidad aumenta con la concentración, siendo diferente la severidad de enfermedad ocasionada con la concentración baja y alta pero la concentración media es igual a la más baja y más alta concentración aplicada. La cepa 4641 muestra que la severidad alcanzada en la concentración más alta es ligeramente inferior pero no diferente a la dosis media. La severidad de enfermedad para la concentración media de la cepa CDP es inferior, pero no diferente a la alcanzada con la concentración más baja, que si es diferente con la producida en la concentración alta para esta cepa.

Tabla 2.1.1-4. Familia MP0003: severidad de la enfermedad a 5 semanas de la inoculación.

Cepa	Inóculo (Concentración)	Severidad (%) *
6297	1*10 ³	1,787 a
álamo	1*10 ⁵	2,334 a
Testigo	0	2,419 a
6297	1*10 ⁴	2,504 a
álamo	1*10 ³	2,582 a
6297	1*10 ⁵	3,930 a
álamo	1*10 ⁴	4,406 ab
CDP	1*10 ³	16,770 abc
4641	1*10 ³	19,701 abc
6522	1*10 ³	23,389 bcd
4641	1*10 ⁴	25,913 bcd
6522	1*10 ⁵	39,491 cd
CDP	1*10 ⁵	41,185 d
6522	1*10 ⁴	40,925 d
4641	1*10 ⁵	43,653 d
CDP	1*10 ⁴	44,515 d

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Tabla 2.1.1-5. Familia CR0025: severidad de la enfermedad a 5 semanas de la inoculación.

Cepa	Inóculo (Concentración)	Severidad (%) *
6297	1*10 ³	3,678 ab
Álamo	1*10 ⁵	2,753 a
6297	1*10 ⁴	3,162 a
Álamo	1*10 ⁴	3,351 a
Álamo	1*10 ³	3,461 ab
Testigo	0	3,519 ab
6297	1*10 ⁵	3,949 ab
6522	1*10 ³	11,786 abc
CDP	1*10 ⁴	13,535 abc
4641	1*10 ³	17,969 abcd
4641	1*10 ⁴	20,054 bcd
CDP	1*10 ³	21,827 cd
6522	1*10 ⁴	24,347 cd
6522	1*10 ⁵	25,061 cd
4641	1*10 ⁵	31,621 d
CDP	1*10 ⁵	35,971 d

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

En la Familia MP0003 (Tabla 2.1.1-4) se observa nuevamente que las cepas Álamo y 6297 son avirulentas. La cepa 4641 muestra un efecto lineal entre concentración y severidad siendo las concentraciones extremas de inóculo diferentes. En la cepa 6522 las severidad no es estadísticamente diferente entre la concentración baja y alta y en la cepa CDP la concentración alta y media ocasiona severidad de enfermedad mayor que la producida en la concentración baja.

Para la familia CR0025 (Tabla 2.1.1-5) el comportamiento de las cepas Álamo y 6297 es similar al que ocurre en las otras familias. En la cepa 4641 aun cuando ocurre un incremento en severidad a medida que aumenta la concentración del inóculo, efecto de la concentración no alcanza a ser diferente. Lo mismo ocurre para la cepa 6522. Sólo para la cepa CDP se da que la severidad de los síntomas producidos sea diferente entre las concentraciones extremas.

En la evaluación a las 8 semanas no se obtuvo efecto de la concentración del inóculo en el análisis de varianza por lo que los datos corresponden al efecto de las cepas sobre las diferentes familias en la prueba.

Tabla 21.1-6. Severidad de la enfermedad a 8 semanas de la inoculación.

Cepa	Severidad a 8 semanas (% medio necrosis tallo) *		
	Fam.CR0025	Fam.MP0003	Fam. PC0032
Testigo	2,446 a	2,260 a	2,643 a
Álamo	2,659 a	2,735 a	3,250 a
6297	2,905 a	3,008 a	3,986 a
6522	56,767 b	83,562 b	68,969 b
4641	69,429 b	82,600 b	65,565 b
CDP	71,413 b	76,489 b	76,525 b

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

La evaluación a las 8 semanas coincide con la evaluación a las 5 semanas en cuanto las cepas Álamo y 6297 se comportan en forma similar al testigo no inoculado, pudiendo separarse las cepas probadas en dos grupos, uno avirulento y otro de alta virulencia.

En ninguna evaluación se logró interacción entre las familias de pino en la prueba y las cepas y concentraciones probadas.

El estudio que incluyó cinco cepas del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la FCF-UdeC muestra que en Chile y de acuerdo a su virulencia existen a lo menos dos grupos de cepas del patógeno *F.circinatum*. Es probable que si se extendiere este tipo de pruebas a otros nuevos aislamientos, los resultados obtenidos se mantendrían por cuanto solo cabrían cepas de posición intermedia.

Dada la susceptibilidad reconocida de *P.radiata* a *F.circinatum* (Hepting 1961, Hodges 2000, 2003) es poco probable que en este patosistema ocurra lo señalado por Kast *et al.* (2002) en el patosistema *Plasmopara viticola-Vitis vinifera* donde un “strain” poco virulento a una variedad puede afectar severamente a otro cultivar. Es probable que aun cuando *F.circinatum* sea un patógeno de introducción reciente en el país, entre 10 y 12 años, exista en forma “natural” poblaciones mezcladas de cepas de alta y baja virulencia (Dwinell *et al.* 1985), dado que la cepa 6297 de baja virulencia tiene similar origen que las cepas 4641 y 6522. (Figura 2.1.1-1).



Figura 2.1.1-1. a.- Vista general de la bandeja, b.- Evaluación a las 5 semanas desde su inoculación (T es el control sin inocular) y c.- Evaluación a las 8 semanas desde su inoculación.

Es importante considerar en pruebas de resistencia cepas de máxima virulencia pues puede ocurrir que algunas pruebas entreguen diferentes resultados, como podría haber ocurrido en pruebas realizadas con material chileno de *P.radiata* por CAMCORE, donde el diferente comportamiento del material en dos pruebas es atribuido a la introducción de una cepa de muy alta virulencia en la mezcla de cepas utilizada en la segunda prueba (Hodges 2001, 2003).

Literatura consultada.

- Barrows-Broaddus, J. y Dwinell, D. 1979. Variation in Virulence of Diverse Sources of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on Virginia and Loblolly Pines. *Phytopathology* 69: 522.
- Barrows-Broaddus, J. y Dwinell, D. 1985. Branch Dieback and Cone and Seed Infection Caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a Loblolly Pine Seed Orchard in South Carolina. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Cooper, Allen. s.a. Pathogen Avirulence and Plant Resistance. The Gene for Gene Theory: A Review. Curso de Botánica 6500. The University of Georgia.
- Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S., Wood, D.L. y Schultz, M.E. 1991. Pitch Canker Disease in California: Pathogenicity, Distribution and Canker Development on Monterrey Pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75: 676-682.
- Dwinell, L.D. 1978. Susceptibility of Southern Pines to Infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Disease Reporter* 62: 108-111.
- Dwinell L. D., Barrows-Broaddus, J. y Kuhlman E.G. 1985. Pitch Canker: A Disease Complex of Southern Pines. *Plant Disease* 69: 270-276.
- Friel, C.J. y Gordon, T.R. 2002. Effects on growth of the pitch canker pathogen by the Monoterpene constituents of pine resin. American Phytopathological Society: Pacific Division Meeting, Abstracts. June 22-24, San Jose. California.
- Gordon T.R., Wikler, K., Clark S., Storer A. y Bonello P. 1999. Resistance to Pitch Canker in Monterrey Pine. Pages 87-89 In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and potential impact of Pitch Canker to Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey CA, USA. 1998.
- Guerra Santos, J.J. 1999. Pitch Canker on Monterrey Pine in Mexico. Pages 58-61. In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and potential impact of Pitch Canker to Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey CA, USA. 1998.

- Hepting, G.H, 1961. *Pinus radiata* susceptible to pitch canker. Plant Disease Report 45: 889-890.
- Hodge, G.R. 2001. Summary of Pitch Canker Research Organized by CAMCORE 1998-2000. Informe mecanografiado. 11 pp.
- Hodge, G.R. 2001. Modified Protocols for Screenings of *P.radiata* for Resistance to Pitch Canker. Informe mecanografiado. 14 pp.
- Hodge, G.R. 2003. 2002 Pitch Canker Screening for Controladora de Plagas Forestales. Informe mecanografiado. 8 pp.
- Kast W.K., Stark-Urnau, M., Seidel, M. y Gemmrich, A.R. 2000. Inter-isolate variation of virulence of *Plamopara viticola* on resistant vine varieties.
http://www.landwirtschaft-mlr-baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1043201_pleft_11/index.html
- Wingfield, M. 1999 a. Opinión. Page 68. In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R (eds) Current and potential impact of Pitch Canker to Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey CA, USA. 1998.
- Wingfield, M. 1999 b. Opinión. Page 92. In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R (eds) Current and potential impact of Pitch Canker to Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey CA, USA. 1998.

4.5. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.1. Virulencia de cepas de *F. circinatum* presentes en Chile.

4.5.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.1.2. Severidad de los síntomas producidos por *F. circinatum* en plantas de *P. radiata*.

4.5.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Un sistema que se ha usado en plantas lignificadas u otros tejidos leñosos de pinos para evaluar la virulencia de *F.circinatum* es la evaluación del tamaño del cancro producido en los puntos de inoculación. Este tipo de inoculación ha sido aplicado preferentemente sobre ramas (MacDonald, Gordon y Bros, 1994; Clark y Gordon 1999) y escasamente en plantas de 1 a 2 años de edad (Blakeslee *et al.*1978; Barnard y Blakeslee 1980).

En esta investigación se inocula diferentes cepas de *F.circinatum* en la base del tallo buscando evaluar la severidad o tamaño del área cubierta por el cancro producido. La información obtenida podría eventualmente aplicarse como procedimiento de trabajo en pruebas de resistencia al cancro resinoso del material obtenido en programas de mejoramiento genético.

Material y método.

El estudio se realizó sobre estacas producidas a raíz cubierta de plantas pertenecientes a las Familias IF17xIF19, PO1027, PC32xBA1, CR19xFA5 y PC9xPC5, de Forestal Mininco S.A. Las plantas de once meses de edad, habían sido producidas en tubetes con corteza de pino en el Vivero Carlos Douglas y trasladadas al invernadero de la Controladora de Plagas Forestales en

Los Ángeles, donde se mantuvieron durante un mes antes de la inoculación. Para cada cepa del patógeno se utilizó 16 plantas de cada una de las cinco familias.

Las plantas fueron inoculadas cuando tenían un diámetro de cuello superior a 4 mm. haciendo una pequeña incisión en la corteza, con escalpelo esterilizado, en la base del tallo y depositando en la herida una gota de 5 µL de una suspensión de esporas (1×10^5 mL⁻¹) de las cepas de *F.circinatum* números 4641, 6522, 6297, Álamo y CDP.

El estudio se evaluó finalmente por mortalidad de plantas.

Resultados y Discusión

Los primeros síntomas que afectaban al follaje, que adquirió color verde opaco a grisáceo, se comenzaron a observar a las cinco semanas desde la inoculación. Luego hubo muerte de follaje que se tornó color café pajizo. Este síntoma que afectaba a todo el follaje no correspondió a lo esperado que era la formación de un cancro localizado en el punto de inoculación. Dado este síntoma y por cuanto algunas plantas en el centro de las bandejas mostraban algunos grados de muerte de corteza del tallo superior, se separó las plantas de cada tratamiento en la bandeja portatubete, dejando una hilera sin ocupar a ambos lados de cada tratamiento.

En este estudio se observó, además, que asociado a la aparición de los primeros síntomas en el follaje, comenzó a aparecer, en la base del tallo en torno a la incisión de inoculación, masas de micelio blanquizo, con producción de microconidias. Luego se observó la presencia de esporodoquios en la misma zona.

La evaluación de los síntomas descritos, que correspondían a un compromiso de toda la planta, se presenta en la Tabla 2.1.2-1 y Figura 2.1.2-1.

Tabla 2.1.2-1. Porcentaje de plantas que muestran síntomas de decoloración del follaje a seis semanas de la inoculación.

Familias	Cepas (%) *					
	Álamo	6522	4641	6297	CDP	Prom. Fam.
PO1027	6,25	87,50	75,00	6,25	68,75	48,75 bc
PC32xBA1	0	31,25	12,5	0	31,25	15,00 a
CR19xFA5	0	68,75	43,75	0	68,75	32,25 b
IF17xIF29	0	68,75	56,25	0	56,28	36,25 b
PC9xPC5	6,25	100	100	25	93,75	65,00 c
Prom. Cepas	2,5 a	71,25 b	57,2 b	6,25 a	63,75 b	

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).



Figura 2.1.2-1. a.- Vista general de los tratamientos, b.- Síntomas en un tratamiento y c.- Signos en zona de inoculación.

En esta evaluación se observa que las cepas Álamo y 6297 presentan muy bajo porcentaje de ataque con respecto a la cepas 6522, 4641 y CDP. Así mismo, la enfermedad es sensiblemente menor en la Familia PC32xBA1 que en material perteneciente a la Familia PC9xPC5.

La presencia de signos, micelio o esporodoquios, en los diferentes tratamientos se presenta en la Tabla 2.1.2-2 y Figura 2.1.2-2.

Tabla 2.1.2-2. Presencia de signos en inoculaciones en tallo en el ensayo, sobre 16 plantas, evaluada a la 6 y 8 semanas desde la inoculación.

Familias	Cepas									
	Álamo		6522		4641		6297		CDP	
	6 sem.	8 sem.								
PO1027	0	0	9	14	9	12	1	1	9	10
PC32xBA1	0	0	4	4	1	2	0	0	1	2
CR19xFA5	0	0	10	12	10	14	0	0	9	14
IF17xIF29	0	0	2	2	5	11	0	0	2	10
PC9xPC5	1	1	14	14	15	15	4	6	14	16

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

La presencia de signos es menor en cepas Álamo y 6297 asociado al menor número de plantas donde la infección fue exitosa.

Tabla 2.1.2-3. Porcentaje de plantas que muestran síntomas de muerte del follaje a 12 semanas de la inoculación.

Familias	Mortalidad de plantas por Cepa (%)					
	Álamo	6522	4641	6297	CDP	Prom. Fam.
PO1027	25	100	100	25	100	70
PC32xBA1	6,25	93,75	87,5	6,25	93,75	57,5
CR19xFA5	0	93,75	100	18,75	93,75	61,25
IF17xIF29	0	93,75	100	0	93,75	57,5
PC9xPC5	31,25	100	100	31,25	100	72,5
Total	12,5 a	96,25 b	97,5 b	16,25 a	96,25 b	

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Los resultados obtenidos al final del estudio indican clara diferencia de virulencia entre las cepas probadas, corroborando resultados obtenidos con otros procedimientos de inoculación (Estudio 2.1.1).

No fue posible, sin embargo, considerar la severidad por tamaño del cancro en el punto de inoculación, como criterio de evaluación. Probablemente, el diámetro del tallo en la zona del cuello, inferior a 5 mm, permite que el hongo inoculado se expanda muy rápidamente por la corteza y circunde el tallo sin que la planta pueda confinarlo como ocurre en tejidos

lignificados. El cancro resinoso ocurre aquí como un cancro difuso, comportamiento que *F.circinatum* presenta en ataques a tejidos suculentos poco lignificados (Estudios 2.2.5 y 4.1.1). De acuerdo a estos resultados, no sería conveniente usar procedimientos de inoculación en la base del tallo para pruebas de resistencia en estacas de pino radiata de menos de dos años.

Literatura consultada.

- Blakeslee, G.M., S.H. Kratka, R.A. Schmidt and C.S. Mosses. 1978. Sporodochia of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var *subglutinans*) as found in diseased slash pines in Florida. Plant Disease Report 62: 656-657.
- Barnard, E.L. and Blakeslee G.M. 1980. Pitch canker of slash pine seedlings: A new disease in forest tree nurseries. Plant Disease 64: 695-696.
- Clark, S. and Gordon, T.R. 1999. Susceptibility of eleven California conifers to pitch canker caused by *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* Pag. 76-77. In. Devey, M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and potential impact of pitch canker in radiata pine. Proc. IMPACT Monterey workshop. Monterey. CA. USA. Nov.30-Dic.3. 1998. CSIRO, Australia.
- Dwinell, L.D. 1988. Comparative pathology of *Fusarium subglutinans* isolated from Monterey pine in California and southern pines. Phytopathology 78: 1607.
- Gordon, T.R., Wikler, K., Clark, S., Storer A. y Bonello P. 1999. Resistance to pitch canker in Monterey pine. Page 87-89. In Devey, M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and potential impact of pitch canker in radiata pine. Proc. IMPACT Monterey workshop. Monterey. CA. USA. Nov.30-Dic.3. 1998. CSIRO, Australia.

4.6. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.1. Virulencia de cepas de *F. circinatum* presentes en Chile.

4.6.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.1.3. Período incubación de *F. circinatum* en plantas de *P. radiata*.

4.6.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El tiempo que va desde que un patógeno penetra al huésped e inicia el proceso infeccioso hasta que se presentan los primeros síntomas es denominado período de incubación. Usualmente, tanto en enfermedades monocíclicas como policíclicas, el período de incubación es relativamente uniforme.

Establecer la duración del período de incubación implica definir un síntoma que se considerara como el inicial. Esta situación es peculiar para el cancro resinoso cuyos síntomas iniciales, que son necrosis de corteza y madera y resinación, solo pueden ser observados por un examen cuidadoso de plantas individuales. Pero, obviamente, este examen no puede realizarse en poblaciones de plantas, como viveros, jardines de setos o plantaciones, donde el primero

síntoma perceptible es clorosis o marchitez, que anteceden a la muerte del follaje que toma color rojizo. El tiempo que ocurre entre la aparición del síntoma de necrosis de tejidos en corteza y madera (cancro) y resinación, y la percepción de síntomas en el follaje puede alcanzar más de 3 años y dependerá de la capacidad del patógeno de colonizar.

Materiales y método

La duración del período de incubación se planteó en un inicio del proyecto ser evaluado en los Estudios 2.1.1 y 2.1.2 antes descritos. Sin embargo, y como en los diferentes estudios se fue observando marcadas diferencias en la expresión de los síntomas, las observaciones se ampliaron a los estudios 2.2.4, 4.3.2 y 4.3.5.

Resultados y discusión

Los tiempos de incubación obtenidos en el estudio y los obtenidos de literatura dependiendo de la forma de inoculación se presentan en la Tabla 2.1.3-1.

Tabla 2.1.3-1. Tiempo de incubación según síntoma.

Estudio	Tiempo (meses)	Inoculación	Síntoma
<i>Pinus radiata</i>			
2.1.1	0,7	decapitación	necrosis tallo
2.1.2	1,2	herida tallo	cambio color follaje
2.2.4	1,2	herida tallo	cambio color follaje
4.3.2	> 12	cortes propagación	clorosis, marchitez, muerte
4.3.5	4 a 36	vivero	clorosis, marchitez, muerte
Arévalo (2001)	7-11	herida tallo	clorosis, enrojecimiento
Dwinell (1999)	0,3	aguja tallo	cambio color tallo, resina
Correl et al. (1991)	13	herida rama Enero	cancro
Correll et al (1991)	15	herida rama Septiembre	cancro
Correl et al (1991)	19	herida rama Mayo	cancro
Otras especies <i>Pinus</i>			
Blakeslee <i>et al.</i> (1978)	0,5	aguja tallo	cancro, resinación
Dwinell (1978)	0,5	brotos	decoloración, resinación
Kuhlman (1987)	1,6	herida tallo	cancro
Kuhlman (1987)	1,8	aguja tallo	cancro
Kuhlman (1987)	2,2	fascículos	cancros
Kuhlman (1987)	2,4	rama podada	cancros
Kuhlman (1987)	3,7	sin herida	cancro
Oak et al. (1987)	1		

El período de incubación es extremadamente variable para todos los procedimientos de inoculación. Barrows-Broadus y Dwinell (1983) describen infecciones inactivas, esto es, el patógeno se encuentra vivo dentro de la planta, cercano al punto de inoculación, pero sin producir ningún síntoma.

No se tiene explicación de cómo y porqué el patógeno se activa o cual sean las razones para grandes variaciones en el período de incubación, tiempo que depende de cualquiera de los tres factores principales que controlan la ocurrencia de enfermedad. Sobre la duración del período de incubación puede influir la virulencia de las cepas, la mayor o menor susceptibilidad de las plantas de pino y los factores ambientales post infección. *F.circinatum*, aparece como un patógeno que puede afectar plantas en cualquier época del año, no es estacional, sin que pueda predecirse cuando tomará la aparición de los síntomas.

Literatura consultada

- Arévalo, O. 2002. Patogenicidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D.Don de 18 meses, mantenidas en contenedor. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Silvicultura. Concepción.
- Barrows-Broadus, J. y Dwinell, L.D. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology* 73: 882-889.
- Blakeslee, G.M., Kratka, S.H., Schmidt, R.A. y Moses, C.S. 1978. Sporodochia of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) as found in diseased slash pine in Florida. *Plant Disease Reporter* 62: 656-657.
- Correl, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S. Wood, D.L. y Schlutz, M.E. 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*) *Plant Disease* 75: 676-682.
- Dwinell, L.D. 1978. Susceptibility of southern pines to infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Disease Reporter* 62: 108-111.
- Kuhlman, E.G. 1987. Effects of inoculation treatments with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on dieback of loblolly and slash pine seedlings. *Plant Disease* 71: 161-162.
- Oak, S.W., Blakeslee, G.M. y Rockwood, D.L. 1987. Pitch canker resistant slash pine identified by greenhouse testing. *Proceedings 19th Tree Improvement Conference* pp 132-139.

4.7. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.1. Virulencia de cepas de *F. circinatum* presentes en Chile.

4.7.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.1.4. Período de latencia de *F. circinatum* en plantas de *P. radiata*.

4.7.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El período de latencia corresponde al lapso de tiempo que va desde la penetración del patógeno a los tejidos del huésped y la formación de nuevo inóculo o unidades de propagación del patógeno.

Aún cuando el período de latencia no se relaciona directamente con la virulencia de un patógeno si puede relacionarse con la capacidad de colonización de nuevos huéspedes o

agresividad del patógeno, otra característica considerada por algunos autores como componente de la patogenicidad.

La estructura masiva de reproducción de *F.circinatum* es el esporodoquio, cuerpo frutal como pequeño cojinete, de entre 1 a 3 mm, de color naranja a salmón, aun cuando puede haberlos de color blanco. Barrows-Broadus y Dwinell (1984) establecen la ocurrencia de microesporodoquios, de 0,06 a 0,2 mm que emergen desde la epidermis del tallo (suculento) vecinos a fascículos. Normalmente, el esporodoquio produce macroconidias en polifialides o monofialides (Blakeslee *et al.*, 1978; Kuhlman y Cade 1985) aun cuando es posible que produzcan microconidias (Stegall 1966), sobre una matriz gelatinosa soluble en agua (Blakeslee *et al.* 1978).

Además de esporodoquios, debe considerarse un signo del patógeno la producción de masas de micelio blanco, con abundante producción de microconidias, en tejidos recientemente colonizados por el hongo, como semillas, cotiledones, tallos verdes o tallos no bien lignificados. Figuras 2.1.4-1, 2.1.4-2 y 2.1.4-3. Este tipo de crecimiento también ha sido observado sobre plantines de *P.patula* (Viljoen *et al.* 1994), desde donde el micelio pasa al sustrato.

En algunos canchros, como el ocasionado por *Nectria* sp. en pino radiata, la formación de las estructuras reproductivas (peritecios) aparecen en otoño en forma claramente estacional. Blakeslee *et al.* (1978) indican que para *F. circinatum* los esporodoquios se encuentran todo en todas las estaciones sobre *P.elliottii*, en ramas con diámetro no mayor de 3 cm. producidos sobre las cicatrices de fascículos caídos.

El primero en señalar presencia de esporodoquios de *F.circinatum* (= *F.lateritium* f.sp. *pini*) fue Hepting (1961) que los observó sobre *P.radiata* artificialmente inoculado. Posteriormente, Stegall (1966) informa sobre esporodoquios en ramas de *P.virginiana* y *P.echinata* de menos de 2 cm. de diámetro, siendo la primera referencia sobre esta estructura producida en forma natural. Kuhlman y Cade (1985) señalan que los esporodoquios ocurren sobre ramas muertas de *P.taeda* y *P.serotina*.

Bernard y Blakeslee (1980), en la primera referencia a presencia de esporodoquios en plantas de vivero, indican la presencia de esas estructuras reproductivas, a nivel del cuello, en tallo de *P.elliottii* var *elliottii*.

Materiales y método

La duración del período de latencia se medio en los Ensayos 2.1.1 y 4.1.1.

Los signos a evaluar son esporodoquios o masas de micelio con producción de microconidias, anotando la fecha de inicio de su formación, usualmente vecinos al área de inoculación.

Resultados y discusión

En las observaciones del proyecto (Tabla 2.1.4-1), el tiempo que va desde la inoculación a la ocurrencia de esporodoquios o masas de micelio con producción de microconidias es altamente variable, pero siempre se observan sobre tejido muerto. En todas las evaluaciones los esporodoquios se han observado produciendo macroconidias.

Tabla 2.1.4-1. Periodo de latencia en observaciones que se indican.

Estudio	Signo	Tiempo meses desde inoculación
2.1.1	masa micelio	0,75
2.1.2	masa micelio	1,2
2.1.2 Mayo 2004	masa micelio	12
4.1.1 julio 2004	esporodoquio	12
Arévalo	esporodoquio	8

Las masas de micelio con abundante producción de conidias que se observan en estudios de invernadero ocurren sobre semillas y en plantines en cotiledones, hipocotilo y nudo cotiledonario, pero también se observan sobre corteza de plantas de cerca de dos años mantenidos en invernadero. No han sido observados en terreno.

Los esporodoquios se han encontrado siempre sobre tejido muerto, por ejemplo, en el borde de canchales, ápices muertos y más comúnmente en la base de los tallos de plantas muertas. Su asociación a tejidos muertos por el hongo hacen que el período de latencia sea largo, en las observaciones del estudio varió entre 8 y 12 meses.

En terreno, han sido observados en plantas de 3 años, pero recientemente muertas (Huinganal), lo que significaría, si la infección se originó en el vivero, un período de incubación y latencia superior.

Literatura consultada

- Arévalo, O. 2002. Patogenicidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D.Don de 18 meses, mantenidas en contenedor. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Silvicultura. Concepción.
- Barnard, E.L. y Blackeslee, G.M. 1980. Pitch canker of slash pine seedlings: a new disease in forest tree nurseries. *Plant Disease* 64: 695-696.
- Barrows-Broadus, J. y Dwinell, L.D. 1984. Variation in susceptibility to the pitch canker fungus among half-sib and full-sib families of Virginia pine. *Phytopathology* 74: 438-444
- Blakeslee, G.M., Kratka, S.H., Schmidt, R.A. y Moses, C.S. 1978. Sporodochia of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) as found in diseased slash pine in Florida. *Plant Disease Reporter* 62: 656-657.
- Hepting, G.H. 1961. *Pinus radiata* susceptible to pitch canker. *Plant Disease Reporter* 45: 889-890.
- Kuhlman, E.G. y Cade, S. 1985. Pitch canker disease of loblolly and pond pines in North Carolina Plantations. *Plant Disease* 69: 175-176.
- Stegall, W.A. 1966. Fruiting of *Fusarium lateritium pini* on naturally infected pine pitch cankers. *Plant Disease Reporter* 50: 476-477.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J. y Marassas, W.F.O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.

4.8. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*

4.8.1. NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.1. *F. circinatum* como causante de damping off.

2.2.1.a. Inoculación de semillas de *P. radiata* con *F. circinatum* bajo condiciones de invernadero

4.8.2. AVANCE A LA FECHA

Introducción.

La presencia de *Fusarium circinatum* (= *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) asociado a semillas de pino fue establecida por Miller y Bramlett (1978a, 1978b) sobre semillas de *P. taeda* y *P. elliotii* var. *elliotii*, donde el patógeno fue determinado internamente en 50% de las semillas estudiadas, en las que causaría un daño interno. Anderson *et al.* (1983) indican presencia de *F. circinatum* (= *F. m. subglutinans*) en semillas de *P. elliotii* de las cuales 34% ocurriría interna en la semilla. La ocurrencia de *F. circinatum* en forma interna en la semilla puede significar algún daño al gametofito y embrión. (Barrows-Broadus y Dwinell. 1985) pudiendo afectar la emergencia.

Las infestaciones e infecciones de *F. circinatum* en semillas pueden alcanzar valores muy altos en algunos lotes de semilla. Runion (1988) indica contaminación semillas con presencia de *F. circinatum* (= *F. subglutinans*) en el 98% de ellas en un lote de semillas de *P. palustris* de las que el 84% correspondería a infección interna. Barrows-Broadus y Dwinell (1985) señalan que la presencia interna del patógeno alcanza a 50% de la semilla en muestras de *P. taeda*. Sin embargo, la infección de *F. circinatum* interna a la semilla no es siempre alta. Dwinell y Fraedrich (1999) indican que en *P. echinata*, solo 1,6% corresponde a infecciones internas y que, en semilla de *P. palustris*, es similar. Lo que difiere de lo evaluado por Runion (ver arriba), siendo probable que los grados de contaminación de la semilla por *F. circinatum* dependan mucho de la procedencia de la semilla y del grado de infección del árbol que la produjo.

Dwinell (1999), en un estudio de conos y semillas de *P. radiata* en California, examina 11 procedencias y determina presencia de *F. circinatum* en 7 de ellas con porcentajes que van desde 12% a 99% de la semilla contaminada. Storer *et al.* (1998, 1999) indican infección de hasta 83% en una procedencia de semilla de *P. radiata* en California.

La infestación superficial de semilla podría provenir de contaminación al abrirse y cerrarse los conos en forma natural, pero no queda claro como ocurre la infección interna (Dwinell 1999). Storer *et al.* (1998, 1999) indican que habría tres tipos de asociación de *F. circinatum* con la semilla de *P. radiata*: a) presencia externa que sería eliminada con tratamientos superficiales, b) presencia interna que sería detectable con medios selectivos y c) presencia interna que no es detectada en medios selectivos pero si en los plantines sano originados de esas semillas consideradas libres del patógeno, este tipo de asociación fue llamado infección críptica.

La infección a la semilla constituye un modo de diseminación a larga distancia del patógeno y probablemente corresponde a la vía de ingreso del hongo al país, a donde pudo haber llegado, como infecciones internas, en semilla de especies mejicanas de *Pinus* importadas para los

programas de mejoramiento genético. Hoy se postula que el centro de origen de *F.circinatum* es México.

Además del efecto de diseminación del patógeno, la semilla con presencia de *F.circinatum* puede significar pobre germinación o emergencia. Storer *et al.* (1998) indican que en semilla con presencia de *F.circinatum* la emergencia alcanza 9% cuando es de 67% en semillas no infestadas.

Otro efecto determinado asociado a semillas contaminadas con el patógeno es la ocurrencia de damping off. Pawuk (1978) establece asociación entre semillas de *P.palustris* contaminadas con *Fusarium* y ocurrencia de damping off. Runion (1987) indica, también para *P.palustris*, que 100% de las plantas originadas de semilla contaminada con *F.circinatum* sufrieron damping off. Dwinell y Fraedrich (1999) con inoculaciones de semilla de *P.radiata*, produjo 22% de damping off de pre-emergencia y 57% de damping off de post-emergencia. En un folleto anónimo, preparado por el “Center for Forestry” del Colegio de Recursos Naturales, U.C. Berkeley (s.a.), se señala que semillas contaminadas con *F.circinatum*, sea externa o internamente, producirán plantas que serán infectadas por el hongo y, cuando esos plantines mueran, el hongo producirá esporas que pueden permanecer en el suelo y eventualmente infectar otros plantines. Consecuentemente, el suelo quedará infestado.

El patógeno *F.circinatum* no ha sido determinado sobre semilla de *P.radiata* en el país. En el presente estudio y otros (Estudios 2.2.1.b y 2.2.3.a) se inocula semilla con *F.circinatum* para conocer y evaluar sus efectos sobre emergencia, damping off y suelo.

Material y Método

La semilla utilizada (Mininco Mezcla CR 92-93) fue esterilizada superficialmente por inmersión durante 20 minutos en peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) y mantenida luego en remojo en agua destilada esterilizada (ADE) por 48 horas, secadas en cámara de flujo y mantenidas en refrigeración para la inoculación.

La semilla fue inoculada por inmersión durante una hora en suspensión de esporas de dos concentraciones ($1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$) de las cepas de *F.circinatum* 6522 y 6297. Las semillas fueron luego tamizadas, secadas y mantenidas en frío (20 horas) hasta la siembra.

El suelo utilizado, de textura arenosa, fue esterilizado (1 hora 100 kP 121°C) en dos días consecutivos y luego depositado en bandejas de papel grueso de aluminio de 30x19x5 cm., que soportaban 6 hileras de siembra con 10 semillas cada una. Dos hileras de siembra contiguas con 20 semillas constituían la unidad experimental. Los tratamientos fueron 2 cepas (6522 y 6297) y tres concentraciones de esporas en la suspensión (0, 10^4 y 10^5), establecidos completamente al azar con 8 repeticiones.

El ensayo fue evaluado por recuentos de emergencia y damping off durante 8 semanas. Una muestra de plantas caídas en los recuentos fue colocada en cultivo de agua para confirmar la presencia de *F.circinatum*.

Con el objetivo de conocer sobre el traspaso del patógenos al suelo desde la semilla y su permanencia en el suelo, una vez finalizado el ensayo inicial, las bandejas se mantuvieron sin riego durante cerca de 3 meses y se sembró semilla no inoculada en dos hileras por bandeja. Así mismo se evaluó la permanencia del inóculo en la semilla.

Resultados

La emergencia promedio del ensayo fue de 61,1% de la máxima esperada, con un máximo de 75,6% y un mínimo de 47,5% (Tabla 2.2.1.a-1).

Tabla 2.2.1.a-1. Emergencia de los tratamientos.

Tratamiento	Emergencia sobre 160 sem. *	Emergencia (%)
Cepa 6297 1*104	119 b	74,3
Cepa 6297 1*105	121 b	75,6
Testigo	98 a	61,2
Cepa 6522 1*104	76 a	47,5
Cepa 6522 1*105	86 a	53,8
Testigo	87 a	54,4

* En las columnas, medias con las mismas letras no difieren significativamente ($p > 0,05$).

La emergencia en el tratamiento de inoculación con la cepa 6297 es claramente superior a la del tratamiento cepa 6522. La baja emergencia observada en los testigos no puede explicarse por una temprana diseminación del patógeno desde semilla inoculada en la bandeja de siembra, como podría ocurrir con el agua de riego. La dispersión de la enfermedad dentro de las bandejas ocurrió en la séptima semana, cerca del término del ensayo (Tabla 2.2.1.a-2).

Tabla 2.2.1.a-2. Damping off de post-emergencia y aéreo en plantas de semilla inoculada con dos cepas de *F.circinatum*.

Tratamientos	Cepa 6297 *	Cepa 6522	
	% damping off	% damping off**	% damping off***
Testigo	4,28 a	25,59 a	5,94 a
Concentr. 1*10 ⁴	4,65 a	42,65 ab	42,65 b
Concentr. 1*10 ⁵	6,39 a	58,36 b	58,36 b

* En las columnas, medias con las mismas letras no difieren significativamente ($p > 0,05$).

** Muerte de planta al término del ensayo (60 días).

*** Muerte de plantas a 55 días del ensayo.

La incidencia de damping off es claramente superior en la cepa 6522 que en la cepa 6297, donde el porcentaje de ataque en los tratamientos es igual al ocurrido en su testigo. Los tratamientos de concentración del inóculo en la cepa 6522 presentan un comportamiento similar claramente superior al testigo hasta una semana antes de finalizar el estudio (tercera columna en Tabla 2.2.1.a-2), situación que cambia al aumentar notoriamente la incidencia de damping off en el testigo en la última semana del estudio. Esta situación se atribuye a crecimiento de micelio desde restos de raicillas colonizadas hacia raicillas sanas vecinas en las bandejas antes que a movimiento de esporas dentro del suelo en la bandeja, de este modo el 80% del ataque que presenta el tratamiento testigo ocurrió en la última semana.

En este ensayo se observaron dos síntomas de damping off poco frecuentes en viveros en el país: damping off aéreo, top damping off (Figura 2.2.1.a-1 y 2.2.1.a-2), que es un tipo de ataque que se inicia desde los cotiledones hacia abajo y que típicamente se relaciona con la

colonización por hongos de la testa de la semilla (Tainter y Baker 1994). El segundo síntoma poco común observado corresponde a marchitamiento de plantas más allá del estado de cotiledón y ya recién iniciado el crecimiento secundario, el que estrictamente no correspondería a damping off, pues esta enfermedad se considera propia de plantas en crecimiento primario. Es altamente probable que las plantas que presentaron este tipo de síntomas se hayan infestado desde inóculo que pasó desde la semilla al suelo y de allí a raíces, sugiriendo una capacidad de diseminación del patógeno desde la semilla infestada.



Foto 2.2.1.a-1. Damping off aéreo, iniciado desde semilla.



Foto 2.2.1.a-2. Damping off aéreo, necrosis de cotiledones y marchitez.

La permanencia del inóculo viable en el suelo se evaluó resembrando las bandejas usadas en el ensayo principal, que habían sido mantenidas sin riego y cubiertas, en el mismo invernadero. Los resultados de esta segunda siembra permiten concluir que *F.circinatum* permanece por cerca de 90 días en el suelo que ha sido sembrado con semilla infestada (Tabla 2.2.1.a-3 y Tabla 2.2.1.a-4).

Tabla 2.2.1.a-3. Emergencia y caída en el total de plantas de las bandejas del ensayo en la primera y segunda siembra. Cepa 6522.

Bandeja	Ensayo 1 *			Ensayo 2 **		
	Emergencia (Número)	Damping off		Emergencia (Número)	Damping off	
		(Número)	(%)		(Número)	(%)
1	35	24	68,6	8	3	37,5
2	40	12	30,0	14	1	7,1
3	14	8	57,1	15	8	53,3
4	7	2	28,6	----	----	----
5	46	12	26,1	17	5	29,4
6	40	10	25,0	12	2	17,7
7	35	24	60,0	17	0	0,0
8	32	11	34,4	8	2	25,0
Promedio	31,1	12,9	41,4	13	3	23,1

* sobre 60 semillas.

** sobre 20 semillas.

Tabla 2.2.1.a-4. Emergencia y caída en el total de plantas de las bandejas del ensayo en la primera y segunda siembra. Cepa 6297.

Bandeja	Ensayo 1 *			Ensayo 2 **		
	Emergencia (Número)	Damping off		Emergencia (Número)	Damping off	
		(Número)	(%)		(Número)	(%)
1	46	3	6,9	13	1	7,7
2	44	3	6,8	----	----	----
3	43	6	13,9	6	5	83,3
4	31	1	3,2	18	9	50,0
5	38	0	0,0	16	0	0,0
6	46	1	2,2	16	4	25,0
7	47	3	6,4	17	2	11,8
8	43	2	4,6	----	----	----
Promed.	42,25	2,38	5,6	14,3	3,4	24,4

* sobre 60 semillas.

** sobre 20 semillas.

La supervivencia del inóculo en el suelo en este estudio es diferente entre las cepas: la cepa 6522 presenta un porcentaje de mortalidad en el total del primer ensayo de un 41,4% y alcanzando solamente de 23,1% de mortalidad en el segundo ensayo. En la cepa 6297, por el contrario, el porcentaje de damping off aumenta en la resiembra desde 5,6% a 24,4%. Este resultado resulta coincidente con la disminución del porcentaje de semilla inoculada de la cepa 6522 que conserva viable el inóculo al sembrar la semilla en medio selectivo para *F.circinatum* (Tabla 2.2.1.a-5).

Tabla 2.2.1.a-5. Porcentaje de semillas inoculadas, positivas a *F.circinatum* después del almacenaje de 80 días.

Cepa	Tratamiento	% semillas positiva
6297	10 ⁴	100
6297	10 ⁶	100
6522	10 ⁴	30
6522	10 ⁶	20
Testigo	0	0

La cepa 6522 muestra menor supervivencia del inóculo sobre la semilla que la cepa 6297, que también muestra claro aumento de mortalidad en la segunda siembra efectuada sobre las mismas bandejas (Tabla 2.2.1.a-4). Este aumento de la mortalidad después de un período libre de plantas puede atribuirse tanto a alta capacidad de supervivencia de las conidias sobre la semilla como a una posible masificación en el suelo del micelio sobre restos de plantas afectadas, como actividad saprofítica.

Los resultados obtenidos en el estudio permiten concluir que *F.circinatum* sobre la semilla puede causar damping off de post emergencia y damping off aéreo, además de mortalidad de plantines ya en crecimiento secundario. Además queda demostrado que el hongo ingresado al suelo con la semilla infestada puede permanecer en éste, donde sirve de inóculo primario para siguientes infecciones, pudiendo, por lo tanto, afectar a plantas en más avanzado estado de desarrollo, lo que sin embargo no fue observado en este estudio cuya duración fue limitada en el tiempo.

Por otra parte, existe diferencia en patogenicidad entre las cepas de *F.circinatum*, medida como incidencia de damping off y también en la supervivencia de *F.circinatum* sobre la semilla es variable y no se relaciona con la virulencia de las cepas.

Literatura consultada

- Anderson R.L. 1986. A new method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Anderson R.L., Belcher E. y Miller T., 1983. Occurrence of internal seed fungi in slash pine seed produced in seed orchards in the United States. In: Seed Testing Assoc. Congress 20th. Ottawa, Canada, reprint 15, 10 pp.
- Barrows-Broadus J. y Dwinell, L.D. 1985. Branch dieback and cone and seed infestation caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a loblolly pine seed orchard in South Carolina. Phytopathology 75: 1104-1108.
- Blakeslee G. 1999. Commentaries, pp 39 In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey, CA. USA.
- Dwinell D. 1999 a. Association of the Pitch Canker Fungus with Cones and Seeds of Pines. Pp. 35-39. In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and Potential

- Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey, CA. USA.
- Dwinell, L.D. 1999 b. Contamination of *Pinus radiata* seeds in California by *Fusarium circinatum*. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reduction, 3-5 Nov. 1997 San Diego, CA.
- Dwinell L.D. and S.W. Fraedrich. 1999. Contamination of Pine Seeds by the Pitch Canker Fungus. In Landis T.D. and J.P. Barnmett. (Tech. Coord.) National Proceedings Forest and Conservation Nursery Association 1998.Gen.Tech.Rep. 25 Asheville. NC. USDA.FS. Southern Research Station 41-42.
- Dwinell L.D. and S.W. Fraedrich. 1997. Management of disease losses through seed treatments of logleaf and shortleaf pines. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reduction, 3-5 Nov. 1997 San Diego, CA.
- Miller T. y Bramblett D.L. 1978. Fungi associated with damage to strobili, cones and seed of slash and loblolly pine. *Phytopathology News* 12: 207.
- Miller T. y Bramblett D.L. 1978. Damage to reproductive structure of slash pine by two seedborne pathogens: *Diplodia gossypina* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Pages 347-355 In Proc. Flowering and seed development in trees: A symposium. USDA, FS. South. For. Exp. Stn., New Orleans.
- Pawuk W.H. 1978. Damping off of container grown longleaf pine seedlings by seed borne Fusaria. *Plant Disease Report* 62:82-84.
- Runion G.B. 1988. Effects of thiabendazole-DMSO treatment of longleaf pine seed contaminated by *Fusarium subglutinans* on germination and seedling survival. *Plant Disease* 72:872-874.
- Storer A.J., Gordon T.R. and Clark S.L. 1998. Association of the Pitch Canker Fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* with Monterey Pine Seeds and Seedlings in California. *Plant Pathology* 47: 649-656.
- Storer A.J., Gordon T.R. and Clark S.L. 1999. The Association of the Pitch Canker Pathogen with Monterey Pine Seeds in California. pp 40-44 In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey, CA. USA.
- Tainter F.H and F.A.Baker .1994. Principles of Plant Pathology. Clemson Book. Clemson University, Clemson. S.C.
- Anónimo. s.a. Pitch canker in Christmas tree farms.
http://forestry.berkeley.edu/comp_proj/Christmastree.pdf

4.9. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.9.1. NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.1.b. Inoculación de semillas de *P. radiata* con *F. circinatum* bajo condiciones de Microparcelas.

4.9.2. AVANCE A LA FECHA

Introducción.

Los resultados de estudios de invernadero con semilla inoculada por *F. circinatum* no necesariamente deben ser similares a los obtenidos bajo condiciones de campo, siendo posible que bajo condiciones de microflora salvaje exista antagonismos u otros fenómenos de competencia entre organismos del suelo y el patógeno agregado que puedan significar menor cantidad de enfermedad.

El objetivo de este estudio es evaluar cantidad y comportamiento de damping off producido y supervivencia del patógeno en el suelo bajo condiciones de terreno.

Material y método.

Las microparcelas correspondieron a cajas de plástico de 40 x 28 x 30 cm, enterradas 2/3 de su profundidad, que se ubicaron en línea, vecinas a platabandas plantadas con estacas de *P. radiata*, en el vivero Carlos Douglas de propiedad de la empresa Forestal Mininco, cercano a Yumbel.

La semilla utilizada correspondiente a mezcla CR92-93 (Forestal Mininco) fue esterilizada por inmersión en peróxido de hidrogeno durante 20 minutos, dejada en agua destilada esterilizada durante 48 horas, luego secada en cámara de flujo y almacenada en frío para su inoculación.

La inoculación se realizó por inmersión de la semilla en suspensiones de esporas con concentraciones de 1×10^4 y 1×10^6 conidias mL^{-1} de las cepas 4641 y 6522.

Los tratamientos fueron inoculación con dos cepas de *F. circinatum*, cada una aplicada en dos concentraciones del inóculo y tratamiento sin inoculación a la semilla, dispuestos en un diseño al azar, donde cada unidad experimental es una parcela con 40 semillas sembradas en dos hileras de 20 semillas cada una, con 5 repeticiones.

La siembra se efectuó a inicios de otoño.

El ensayo se evaluó por plantas supervivientes a las 14 y 40 semanas. Además, se tomó muestras de suelo en todas las microparcelas para determinar presencia de *F. circinatum*.

Resultados y discusión

La emergencia en los tratamientos se inició pasado los 30 días, probablemente producto de las bajas temperaturas en el vivero. Los primeros casos de plantas muertas ocurrieron como damping off tardío, cuando las plantas tenían cuatro a cinco semanas de emergidas y luego, la mortalidad continuó sobre las plantas ya en crecimiento secundario, con síntomas de clorosis, marchitez y muerte. No se observó casos de ataques que se inician desde la testa a los cotiledones como ocurre en invernadero (Estudio 2.2.1.a-1).

En el estudio ocurrió severo daño por aves en una microparcelas (segunda repetición en tratamiento sin inoculación) por lo que se debió descartar esa unidad experimental (Figura 2.2.1.b-1).

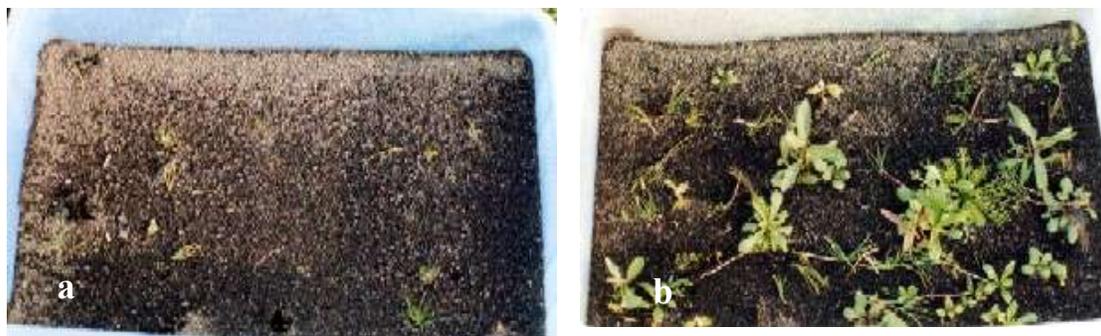


Figura 2.2.1.a-1.- Caída de de plantas en inoculación a la semilla (microparcela) y b.- Daño producido por aves en una microparcela.

El ensayo se evaluó por plantas sobrevivientes a las 14 semanas (Tabla 2.2.1.b-1) observándose un claro efecto de la concentración del inóculo en la supervivencia. Los muestreos de plantas muertas fueron positivos a la presencia de *F.circinatum*.

El ensayo se levantó a las 40 semanas, oportunidad en que las plantas se clasificaron como sin síntomas, con síntomas de marchitamiento y muertas (Tabla 2.2.1.b-1). Todas las plantas remanentes fueron llevadas a laboratorio para realizar aislamientos en medio selectivo desde el cuello y raíces.

Tabla 2.2.1.b-1. Plantas supervivientes a 14 y 40 semanas de sembrado el ensayo, separando las plantas sin síntomas, con síntomas y muertas e indicando el número de plantas positivas a *F.circinatum* en cada categoría.

Tratamientos	14 semanas	40 semanas						Suelo **
		Asintomáticas		Sintomáticas		Muertas		Presencia
	Plantas vivas	Total	Posit *	Total	Posit *	Total	Posit *	F.circinatum
4641 10 ⁴	35 a	12	2	2	2	1	1	1/5
4641 10 ⁶	9 b	1	0	0	0	0	0	0
6522 10 ⁴	99 c	28	4	3	3	3	2	3/5
6522 10 ⁶	10 b	1	0	1	1	0	0	1/5
Testigo	125 c	41	0	0	0	0	0	0

* Plantas positivas a presencia de *F.circinatum*.

** Número de microparcelas sobre 5 con presencia de *F.circinatum* en el suelo.

Los datos obtenidos demuestran la presencia de *F.circinatum* en 7,2% de las plantas que no presentaban síntomas. Este tipo de infección puede simplemente corresponder a los primeros estados de establecimiento de la infección o a lo que algunos autores llaman infecciones crípticas (Storer *et al.* 1998; Gordon *et al.* 2001). Estas plantas sirven como el paso de la enfermedad desde el vivero a plantación. Algunos autores (Dwinell 1999; Dwinell y Fraedrich

1999) consideran que las infestaciones en semilla terminan en el vivero como damping off de pre y postemergencia, aun cuando el suelo pueda quedar infestado.

Puede concluirse que *F.circinatum* sobre la semilla puede causar muerte de plantas hasta meses después de la siembra u ocurrir en plantas sin que éstas aun muestren síntomas de la enfermedad y que, además, el patógeno puede contaminar el suelo donde se ha sembrado la semilla inoculada, probablemente después de haberse multiplicado sobre los tejidos que ha infectado.

Literatura consultada

- Dwinell D. 1999 a. Association of the Pitch Canker Fungus with Cones and Seeds of Pines. Pp. 35-39. In Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterrey, CA. USA.
- Dwinell L.D. and S.W. Fraedrich. 1999. Contamination of Pine Seeds by the Pitch Canker Fungus. In Landis T.D. and J.P. Barnmett. (Tech. Coord.) National Proceedings Forest and Conservation Nursery Association 1998.Gen.Tech.Rep. 25 Asheville. NC. USDA.FS. Southern Research Station 41-42.
- Gordon T.R., A.J. Storer and D.L. Wood. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85: 1128-1139.
- Storer A.J., Gordon T.R. and Clark S.L. 1998. Association of the Pitch Canker Fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* with Monterey Pine Seeds and Seedlings in California. Plant Pathology 47: 649-656.

4.10. NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*

4.10.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.1.c. Inoculación del suelo con *F. circinatum* bajo condiciones de invernadero.

4.10.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Aun cuando hay referencias generales a la presencia de *F.circinatum* en el suelo de viveros asociado a ataques de plantas de Pinus en el primer año de viverización (Barnard y Blakelee 1980; Carey y Kelly 1994) o a la ocurrencia del patógeno en el suelo (Wickler *et al.* 2003) no hay trabajos publicados sobre ocurrencia de ataques tempranos en viveros, como damping off y u otros, asociados a *F.circinatum*. Dwinell y Fraedrich (1999) inducen damping off desde semillas infestadas y otros autores señalan que suelos de viveros infestados al sembrar semillas infestadas (o infectadas) quedan contaminados con el hongo (Center for Forestry, s.a.; Gordon *et al.* 2001) pero no aportan antecedentes específicos sobre los problemas que las poblaciones de *F.circinatum* establecidas en el suelo vayan a ocasionar a los cultivos subsecuentes en esos viveros.

Resultados generales de un trabajo sobre inoculación al suelo, aun no publicado en su resultado final, fue presentado por Aeger (2005) donde indica que con inoculaciones de 100, 1.000, 10.000 y 100.000 esporas por gramo de suelo ocurre “una dramática respuesta al aumento decenal del inóculo con hasta 100% de mortalidad en los más altos niveles de concentración”.

La capacidad de *F.circinatum* para causar damping off en los viveros de pinos ha sido escasamente mencionada. Dwinell y Fraedrich (1999) lo citan asociado a infecciones de semilla en *P.radiata* y Viljoen *et al.* (1994) como causante de damping off y pudriciones de raíces sobre *P.patula* en Sudáfrica. Las informaciones sobre ataques de *F.circinatum* en plantas de más edad y mantenidas en viveros (seedlings) hasta dos años son más frecuentes (Barnard y Blakeslee 1980, Kuhlman 1987, McCay-Buis *et al.* 1994, Carey y Kelley 1994, Gordon *et al.*, 2001).

La aparente escasa participación de *F.circinatum* como causante de damping off en los viveros puede deberse solamente a que no ha sido buscado, por tratarse el damping off de una enfermedad muy común y asociada a diferentes especies de hongos, entre ellos, varias otras especies de *Fusarium*.

El problema que puede representar la presencia de *F.circinatum* como causante de damping off en un vivero, es que, tal como ocurre con *Phytophthora cinamomi* y *Macrophomina phaseolina* en los viveros en Chile, el inóculo se multiplica con cada planta afectada y ese nuevo inóculo es un aporte a la carga de inóculo que permanece en el suelo pudiendo infectar plantas hasta el final de la estación o en las producciones subsecuentes.

El ataque de *F.circinatum* en los viveros infestados en el país ocurre indistintamente en sistemas de producción a raíz cubierta y raíz desnuda pero no hay información sobre ocurrencia de damping off o ataques tempranos en ningún vivero con determinación positiva.

Con el objetivo de reunir antecedentes sobre procedimientos de inoculación de *F.circinatum* al suelo, observar el comportamiento del patógeno como causante de damping off y evaluar la permanencia del inóculo en el suelo se han realizado estudios de procedimiento de inoculación y de comparación de patogenicidad entre especies de *F.circinatum* y *F.oxysporum* y cepas de *F.circinatum*.

Material y método

Este estudio incluyó tres ensayos separados. El primero consistió en comparar métodos de inoculación de suelo con *F.circinatum*, en el segundo se compararon diferentes cepas de *F.circinatum* y aislamientos de *F.oxysporum* inoculadas al suelo y en el tercer estudio se evaluó la supervivencia del inóculo agregado al suelo.

1. Estudio de métodos de inoculación:

Se comparó inóculo preparado sobre granos de avena (Viljoen *et al.*1994) con inóculo preparado con harina gruesa de maíz (James *et al.* 1989). Los granos de avena (25 g) previamente hidratados se esterilizaron en matraces con 250 ml de agua destilada en dos días consecutivos (20 min. 100 kPa). Posteriormente, los granos de avena en los matraces fueron inoculados con tres discos de 9 mm de diámetro de cultivos monospóricos de *F.circinatum*, cepas PR-4641 y C-6297, y los matraces mantenidos a 25°C, por dos semanas, con agitación manual diaria. El inóculo de harina gruesa de maíz se preparó en moldes de metal (30 x 11 x 7 cm) con una mezcla de 150 g de harina gruesa de maíz mezclada con 300 ml de PDA al 1% en caliente; después de 15 minutos de reposo se agregó 75 g de perlita a la mezcla. El molde se recubrió con papel de aluminio y se esterilizó en autoclave por 60 minutos (100 kPa). La masa,

una vez fría, fue cortada en cámara de flujo en trozos de aproximadamente 1 cm² con bisturí esterilizado e inoculada con cultivos de la cepa C95297 de *F.circinatum*. Adicionalmente se agregó 50 ml de agua destilada esterilizada (ADE) y se cubrió nuevamente con papel de aluminio. Los moldes sellados fueron incubados a 25°C por tres semanas. Posteriormente, la mezcla de inóculo se secó al aire por tres días y se almacenó en bolsas plásticas en refrigerador para su uso.

El suelo utilizado en el estudio corresponde a suelo de textura arenosa y fue esterilizado en dos días consecutivos (60 min. 100 kPa).

La inoculación con granos de avena se realizó de dos modos:

- a) Colocando un grano de avena por cada semilla de pino (20/bandeja).
- b) Distribuyendo 40 granos en la superficie de la bandeja.

La inoculación con harina gruesa de maíz se realizó mezclando:

- a) Una parte de inóculo por 25 partes de suelo.
- b) Una parte de inóculo por 50 partes de suelo.

La semilla de pino utilizada fue mantenida en remojo por 48 horas y luego esterilizada superficialmente por 5 minutos con NaOCl al 0,5%, lavada con ADE y secada al aire en cristalizador de vidrio.

La siembra se realizó en bandejas de papel de aluminio grueso de 18 x 10 x 5 cm con dos hileras de siembra de 10 semillas cada una.

El número de repeticiones fue 10 y el ensayo se evaluó por recuento de plantas emergidas y plantas afectadas de damping off.

La presencia de *F.circinatum* en las plantas afectadas fue determinada por cultivo en agua.

2. Ensayo de inoculación de suelo con diferentes cepas de *F.circinatum* y *F.oxysporum*.

Las cepas *F.circinatum* probadas fueron C-6297, PR-6522, PR-4641, QC-01, PT-1-C, Seto A y Álamo, y de *F.oxysporum* las cepas LZ-3, Agua raíces Vivero Carlos Douglas y Agua raíces Vivero San Isidro. Cada una de estas cepas fue inoculada sobre avena esterilizada (Viljoen *et al.* 1994) para ser inoculadas al suelo.

El suelo fue esterilizado en autoclave (20 min. 100 kPa) y depositado en bandejas de papel de aluminio de 20 x 15 x 5 cm. La semilla (CR 92-93, Mininco) fue esterilizada superficialmente por inmersión durante 20 minutos en H₂O₂. La siembra se efectuó colocando 10 semillas de pino regularmente espaciadas en el fondo del surco de siembra y la inoculación, colocando un grano de avena entre cada semilla.

Cada bandeja de siembra llevó 2 hileras de siembra inoculadas con una misma cepa de los patógenos en estudio. El número de repeticiones fue 10 y el ensayo se evaluó por recuento de plantas emergidas y plantas con damping off u otro síntoma.

La presencia de *F.circinatum* en las plantas afectadas fue determinada por cultivo en agua.

El ensayo se mantuvo durante 70 días en invernadero (CPF, Los Angeles) y luego las bandejas fueron cubiertas y mantenidas en el invernadero durante 87 días.

3. Ensayo de resiembra sobre suelo inoculado:

Las bandejas usadas en el ensayo 2 (inoculación de suelo con diferentes cepas) fueron mantenidas sin riego por 87 días en el invernadero, después se reubicaron en los mesones del invernadero (CPF, Los Angeles) y se sembraron con semilla esterilizada durante 20 minutos en peróxido de hidrógeno, lavadas en ADE, sometidas a remojo durante 48 horas y secadas al aire.

Resultados y discusión.

1. Estudio de métodos de inoculación.

Los resultados muestran un comportamiento diferente entre las dos cepas de *F.circinatum* en el ensayo (Tabla 2.2.1.c-1). La cepa 4641 puede causar damping off de pre y postemergencia y la cepa 6297 aparece como muy poco patógena en ambas pruebas (Tabla 2.2.1.c-2).

Tabla 2.2.1.c-1. Emergencia y mortalidad de plantas sobre suelo inoculado con *F.circinatum* en avena.

Tratamientos	Emergencia 100	Damping off (postemergencia)		Recuperación <i>F.circinatum</i>	
	Semillas (*)	Nº	% (*)	Nº	%
PR 4641 surco	21 ^a	16	73,6 ^c	15	93,7
PR 4641 bandeja	27 ^a	10	25,8 ^b	10	100
C6297 surco	46 ^b	0	0,0 ^a	---	----
C6297 bandeja	41 ^b	1	1,8 ^{ab}	1	100
Testigo surco	47 ^b	2	4,0 ^{ab}	1	50,0
Testigo bandeja	41 ^b	0	0,0 ^a	---	----

(*) Letras iguales indican ausencia de diferencia $p \geq 0,05$

La ocurrencia de damping off de pre emergencia en los tratamientos de inoculación con la cepa 4641 se reconoció abriendo cuidadosamente los surcos para observar el estado de la germinación. Las semillas en germinación mostraban lesiones necróticas inmediatamente en los cotiledones, bajo la semilla, con la radícula sana, de las cuales se recuperó el patógeno (Figura 2.2.1.c-1a).

En una bandeja del tratamiento sin inoculación (testigo) ocurrió damping off en 2 plantas y en una de ellas se recuperó *F.circinatum*, lo que se considera producto de contaminación, probablemente desde plantas con damping off en bandejas vecinas. Este problema no afectó los resultados obtenidos.

La cepa 6297 usada en la preparación de inóculo con harina gruesa de maíz muestra ausencia de patogenicidad inoculada con este sistema (Tabla 2.2.1.c-2).

Tabla 2.2.1.c-2. Emergencia y mortalidad de plantas sobre suelo inoculado con *F.circinatum* en harina gruesa de maíz.

Tratamientos (mezcla inóculo:suelo)	Emergencia 100 semillas	Damping off (postemergencia)		Recuperación <i>F.circinatum</i>	
		Nº	%	Nº	%
6297 (1:25)	36	0	--	--	--
6297 (1:50)	31	0	--	--	--
Testigo (1:25)	47	1	2	0	0
Testigo (1:50)	50	0	--	--	--

A pesar de la diferencia en emergencia, no se obtuvo evidencia damping off de preemergencia en el ensayo.

La notoria baja patogenicidad en el ensayo de las cepa 6297 podría deberse a mutaciones durante la incubación de las colonias en un medio rico como es PDA, situación que es dable de ocurrir en especies del género *Fusarium* (Oswald 1948, Booth 1971). La cepa 4641, que se mantuvo bajo las mismas condiciones de incubación, no habría sufrido tales mutaciones, conservándose como patógena.

La falta de agresividad de la cepa 6297 inoculada sobre avena y sobre harina gruesa de maíz no permite comparar la eficiencia de ambos tipos de inóculo. A pesar de ello, se decidió utilizar en los estudios siguientes el inóculo de granos de avena por la facilidad de preparación y de inoculación.

2. Ensayo de inoculación de suelo con cepas diferentes.

Los resultados del ensayo dejan de manifiesto una capacidad de causar enfermedad (damping off) extremadamente variable de las cepas de *F.circinatum* y de *F.oxysporum* (Tabla 2.2.1.c-3). La emergencia en los tratamientos inoculados con las cepas *F.circinatum* 6522, 4641, QC01 y Seto A es nula, producto de un severo ataque de damping off de pre-emergencia que se comprobó abriendo cuidadosamente los surcos de siembra cuando se consideró terminada la emergencia en los testigos (dos semanas consecutivas sin nueva emergencia). La cepa PTC1 presenta emergencia de algunas plantas pero todas las plantas que emergen terminan atacadas por el patógeno.

La mortalidad es más baja en las cepas Álamo y 6297, siendo esta última la que presenta el valor más bajo de ataque en el ensayo. La baja capacidad de producir damping off de post-emergencia de la cepa 6297 en el ensayo concuerda con los resultados del ensayo de procedimientos de inoculación, sin embargo ocasiona algún grado de ataque de damping off de pre-emergencia (Tabla 2.2.1.c-3).

Las tres cepas probadas de *F.oxysporum* también muestran diferente capacidad para producir damping off o mortalidad temprana de plantas ya en crecimiento secundario. En este grupo, la cepa obtenida en el vivero Carlos Douglas desde agua que percolaba desde los tubetes presenta prácticamente nula patogenicidad (Tabla 2.2.1.c-3).

Tabla 2.2.1.c-3. Emergencia y damping off en suelo inoculado con diferentes cepas de *F.circinatum*.

Tratamiento	Emergencia	Damping off		Observaciones
		(número)	(%)	
<i>F.circinatum</i>				
6522	0	100	100	Preemergencia
4641	0	100	100	Preemergencia
QC01	0	100	100	Preemergencia
Seto A	0	100	100	Preemergencia
PTC1	12 a	12	100	Preemergencia Postemergencia
Álamo	53 c	25	47,2	Postemergencia
6297	33 b	6	18,2	Postemergencia
<i>F.oxysporum</i>				

Agua SI	55 c	32	58,2	Postemergencia
LZ3	49 c	22	44,9	Postemergencia
Agua CDP	83 e	3	3,6	Postemergencia
Testigo	68 d	10	14,7	Postemergencia

En el ensayo, *F. circinatum* es capaz de causar damping off de pre y de postemergencia y, además, de causar mortalidad de plantas en su séptima semana desde la emergencia, ya en claro crecimiento secundario (Figura 2.2.1.c-1 y 2.2.1.c-2).



Figura 2.2.1.c-1. Damping off causado por *F.circinatum*. Se observa micelio sobre el tallo

La presencia de abundante micelio sobre las plantas atacadas por *F.circinatum* no es una característica que se observe asociada con otros hongos que causan damping off en los viveros forestales en Chile y tampoco en otros países, ya que Viljoen *et al.* (1994) la señalan para Sudáfrica en ataques del patógeno sobre *P. patula*. En el micelio observado hay producción masiva de microconidias y de macroconidias, las que probablemente reinfestan el suelo al escurrir con el agua de riego y pueden infestar otros tratamientos del ensayo al ser liberadas y diseminadas por el aire con las corrientes que debe producir los equipos de enfriamiento del aire o el movimiento de personas en el invernadero. En el ensayo se produjo muerte de plantas en el tratamiento testigo inoculado con granos de avena no colonizados por el patógeno. En este tratamiento más del 50% de las plantas que murieron fueron afectadas en las últimas semanas (Figura 2.2.1.c-2) sugiriendo que pudo haber ocurrido contaminación del suelo desde las bandejas inoculadas con *F.circinatum*.



Figura 2.2.1.c-2. Marchitamiento de plantas de pino en plantas más allá del estado de cotiledón. (Damping off tardío). Micelio en la base del tallo.

Esta característica de ataque más allá del estado de crecimiento primario marca también otra diferencia entre ataques de *F. circinatum* y los hongos que típicamente causan damping off en pino, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp y *Pythium* spp. Solamente *Macrophomina phaseolina* muestra ataques sobre plantas ya en el primer crecimiento secundario.

Las plantas remanentes del ensayo fueron transplanta a maceteros pequeños con substrato de corteza de pino y mantenidas en el invernadero. Estas plantas mostraron muy rápidamente marchitez que pudo ser causada no por el patógeno sino por un defectuoso sistema radical al ser crecidas en bandejas de poca profundidad. Para dilucidar este punto las plantas fueron llevadas a laboratorio para determinar la presencia de *F.circinatum*.

3. Ensayo de resiembra sobre suelo inoculado

En todos los tratamientos del ensayo, sembrado después de 87 días de haberse extraído todas las plantas y almacenado las bandejas, ocurre mortalidad. (Tabla 2.2.1.c-4). La emergencia alcanzada en este ensayo, es claramente mayor que la emergencia obtenida en el primer ensayo (Tabla 2.2.1.c-3) y no ocurren tratamientos con altos porcentajes de damping off de preemergencia. Los tratamientos donde solamente ocurrió damping off de preemergencia si hubo ataque de damping off de postemergencia, dejando de manifiesto la capacidad de supervivencia del inóculo de *F.circiantum* en el suelo (Tabla 2.2.1.c-4). El damping off de post emergencia, en los tratamientos que lo mostraron en la primera siembra, es inferior en la segunda siembra, excepto en la cepa 6297 que subió su incidencia de 18,2% a 27,4%. Un resultado similar para esta cepa se obtiene en el ensayo de inoculación a la semilla en

invernadero (Estudio 2.2.1.a) sugiriendo que esta cepa tiene alta capacidad saprofítica y, establecida en el suelo, la cepa tiende a recuperar su virulencia.

Tabla 2.2.1.c-4. Emergencia y damping off en resiembra de suelo inoculado con diferentes cepas de *F.circinatum*.

Tratamiento	Emergencia (número)	Damping off		
		(número)	(%)	primera siembra (%)
<i>F.circinatum</i>				
6522	79	47	59,5	100 pre
4641	82	47	57,3	100 pre
QC01	72	63	87,5	100 pre
Seto A	83	67	80,7	100 pre
PTC1	76	57	75,0	100 pre post
Álamo	81	23	28,4	47,2
6297	84	23	27,4	18,2
<i>F.oxysporum</i>				
Agua SI	70	2	5,7	58,2
LZ3	77	28	36,4	44,9
Agua CDP	79	3	3,4	3,6
Testigo	133	72	54,1	14,7

La supervivencia de un patógeno entre cultivos es un aspecto de mayor importancia para estudiar las posibilidades de manejo de una enfermedad producida por un organismo cuyo inóculo persista en el suelo. Garret (1956, 1970) clasifica en dos categorías a los hongos que infectan raíces como patógenos: a). patógenos primitivos habitantes de suelo y b). patógenos especializados como habitantes de raíces. El primer grupo corresponde a hongos de amplio rango de huéspedes y con una alta capacidad saprofítica, lo que los hace muy difícil de controlar con prácticas de manejo como uso de cultivos intercalares o períodos libre del huésped.

No es posible establecer conclusiones sobre el modo de supervivencia de *F.circinatum* en el suelo del ensayo. El hongo no posee clamidosporas ni forma otras estructuras de resistencia a condiciones adversas de medio pero, como señala Gordon (1999) sobrevive mejor que *F.oxysporum*. La capacidad saprofítica no parece haber sido estudiada específicamente para *F.circinatum* como lo ha sido para *Thielaviopsis basicola* (Hood y Shew 1997), pero puede asumirse que no debe ser muy alta, debido a que la incidencia de damping off disminuye para todas las cepas, excepto la de más baja agresividad (6297) que aumenta ligeramente la incidencia de damping off. Los datos del ensayo no permiten, sin embargo, lograr evidencia en cuanto a variaciones en las poblaciones de *F.circinatum* en el suelo. Solamente es claro que el inóculo persiste en el suelo por un tiempo equivalente al período que va entre cosecha y siembra de un vivero.

No puede considerarse que *F.circinatum* se comporte como un hongo de suelo en el sentido clásico de “hongo habitante de suelo” (soil inhabiting fungi) *sensu* Garret (1956), básicamente porque su rango de huéspedes es estrecho y su presencia en el suelo es poco frecuente. En este ensayo, el patógeno inoculado en el suelo produce enfermedad y permanece produciéndola

después de un período libre del huésped de aproximadamente 90 días, siendo posible que, como indica Bateman (1963) para *Thielaviopsis basicola*, la acción saprofítica esté restringida a una asociación con las raíces del huésped, en este caso sobre restos de raíces de plantas muertas anteriormente en el ensayo.

Cual sea la actividad ecológica de *F.circinatum* en el suelo debe ser investigada para poder establecer planes de manejo, ya que es evidente que el patógeno está establecido en los viveros más importantes, y es más probable, su dispersión a otros viveros que su erradicación de los viveros en los que está asentado.

Literatura consultada

- Barnard E.L. and G.M. Blakeslee. 1980. Pitch Canker of Slash Pine Seedlings: A New Disease in Forest Tree Nurseries. *Plant Disease* 64: 695-696.
- Bateman D.F. 1963. Influence of host and non-host plants upon population of *Thielaviopsis basicola* in soil. *Phytopathology* 53: 1174-1177.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Carey W.A. and W.D. Kelley. 1994. Late season mortality in long leaf pine nurseries caused by *Fusarium subglutinans*. *Phytopathology* 84:1096 (Abstract).
- Dwinell D.L. and S.W. Fraedrich. 1999. Contamination of pines seed by the pitch canker fungus. In Landis T.D. and J.P. Barnett (Tech. coord) National Proceedings Forest and Conservation Nursery Association-1998. Gen. Tech. Rep. 25. Ashville, NC. USDA. FS. Southern research Station 41-42.
- Garret D.S. 1956. Biology of root infecting fungi. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Gordon T.R., A.J. Storer and D.L. Wood. 2001. The Pitch Canker Epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128-1131.
- Gordon T.R. 1999. Opinión. p 59 In
- James R.L., R.K. Dumrose, C.J. Gilligan and D.L. Wenny. S.A. Pathogenicity of *Fusarium* Isolates from Douglas-fir seed and Container-grown Seedlings. s.e.
- Kuhlman E.G. 1987. Effects of Inoculation Treatment with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on Dieback of Loblolly and Slash Pine Seedlings. *Plant Disease* 71: 161-162.
- McCay-Buys, T.S. Abney, R.Bb. Cummins and D.M. Huber. 1994. Pitch Canker Disease of White Pines seedlings in Indiana. *Phytopathology* 84: 1122 (Abstract).
- Roa, P. 2002. Patogenicidad de *Fusarium circinatum* (*Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*) en los primeros estados de desarrollo y crecimiento de *Pinus radiata* D.Don. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Silvicultura. Concepción.
- Viljoen A. And M.J. Wingfield. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.

4.11.NOMBRE DE LA META.

META 2**2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.**

4.11.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.2. Patogenicidad de *F. circinatum* en vivero con producción de plantas a raíz desnuda.**2.2.2.a. Inoculación retrasada del suelo con *F. circinatum* en bandejas.**

4.11.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La oportunidad en que el inóculo de *F.circinatum*, conidias, alcanza el suelo de un vivero y produce enfermedad no ha sido estudiada. Muchos autores consideran que la semilla infestada con el patógenos sería el modo como éste se instala en un vivero, originando damping off (Dwinell 1999, Dwinell y Fraedrich 1999) o produciendo muerte de plantas en más avanzado estado de desarrollo (Anderson 1986, Blakeslee 1999). En ambos casos, *F.circinatum* multiplicaría su población desde las plantas afectadas. La probabilidad que el hongo arribe a un vivero con plantas en activo crecimiento y se establezca en el suelo originando ataques tardíos no parece haber sido estudiada.

El propósito de este estudio es observar la ocurrencia de enfermedad sobre plantas mantenidas en macetero cuando el suelo es inoculado en diferentes oportunidades en el curso del desarrollo de las plantas.

Material y método.

Maceteros con suelo tratado con formalina 2% fueron sembrados después de un período de aireación con semillas de pino radiata tratada con NaClO (0,5% durante 5 minutos). Los maceteros fueron mantenidos a nivel del suelo, en un sector de sombreadero, en el vivero Carlos Douglas (Forestal Mininco).

El suelo de los maceteros con plantas establecidas fue inoculado con una mezcla de suspensión de esporas de las cepas 4641 y 6522 a los 30, 60, 90 y 120 días desde la siembra, con una concentración de 5000 esporas/mL, a cada macetero se le aplicó 5 mL.

Este estudio estaba originalmente planificado para efectuarse en invernadero con plantas creciendo en bandejas, sin embargo y visto que el crecimiento en bandejas de escasa profundidad difícilmente permitiría adecuado crecimiento hasta la duración estimada del estudio mayor a seis meses, se decidió cambiar el estudio a uno en maceteros y en terreno. Ubicado en el vivero Carlos Douglas, este ensayo sufrió severo daño de animales en varias oportunidades. Primero ocurrió daño de ratones que comieron la semilla agregada a las macetas. Luego, la resiembra que se realizó en invernadero sufrió ataque de conejos cuando, con las plantas ya emergidas, los maceteros fueron trasladados al exterior.

Una nueva siembra se realizó manteniendo los maceteros bajo un túnel fabricado con malla y cañerías de plástico semi-rígido, lo que permitió evitar daño por animales pero que exigió, dado el espacio posible de cubrir, reducir la superficie del ensayo. Por esta razón se decidió inocular el suelo con una mezcla de cepas y no con ambas cepas en forma separada como se estaba indicado.

Resultados

En el estudio se observó muy escasa emergencia de las semillas (alrededor de un 40%) y la mortalidad por *F. circinatum* también fue baja (Tabla 2.2.2.a-1), probablemente porque el hongo no fue capaz de alcanzar las raíces de las plántulas.

Tabla 2.2.2.a-1. Porcentaje de plantas afectadas por *F. circinatum* en los distintos tiempos de inoculación.

Tiempo de Inoculación (días)	Tratamiento	Mortalidad (%)	Plantas asintomáticas (%)	Plantas afectadas por <i>F.circinatum</i>
0	Testigo	0	0	0
	Inoculado	5	7,5	12,5
30	Testigo	0	0	0
	Inoculado	2,5	0	2,5
60	Testigo	0	0	0
	Inoculado	4,8	2,4	7,1
90	Testigo	0	0	0
	Inoculado	2,6	5,1	7,7
120	Testigo	0	0	0
	Inoculado	0	10,3	10,3

Aun cuando las poblaciones de plantas obtenidas en el ensayo fueron bajas, se demuestra la capacidad de *F.circinatum* en el suelo para infestar plantas en diferentes estados de desarrollo en el momento de la inoculación.

Así mismo, es claro que el patógeno ha infestado plantas que no muestran síntomas de la infección (Tabla 2.2.2.a-1).

Literatura consultada

- Anderson, R.L. 1986. A new methods for assessing contamination of slash and loblolly pines seeds by *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Blakeslee, G.M, 1999. Oipinión, p.39. In Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (esd) Current and potential impactat of pitch canker in radiata pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, Ca. 30 Nov. To 3 Dec. 1998.
- Dwinell, L.D. 1999. Association of the pitch canker fungus with cones and seeds of pines. In: Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (esd) Current and potential impactat

of pitch canker in radiata pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, Ca. 30 Nov. To 3 Dec. 1998.

Dwinell, J.D y Fraedrich, S.W. 1999. Contamination of pine seeds by the pitch canker fungus. National Proc. Forest and Conservation Nursery Association, 1998. USDA. FS. Southern Research Station, Gen. Tec. Rp. SRS-25.

4.12.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.12.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.2.b. Inoculación retrasada del suelo con *F. circinatum* en microparcels.

4.12.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Este estudio corresponde a observaciones del comportamiento en terreno de inoculaciones de suelo con *F.circinatum* realizadas durante los primeros meses de crecimiento de plantas de pino radiata en vivero y puede considerarse como una variación de un estudio anterior en macetas (Estudio 2.2.2.a).

El objetivo del estudio es observar el comportamiento de la enfermedad en plantas donde el suelo es inoculado en diferentes estados de crecimiento y desarrollo de las plantas.

Material y método.

El ensayo se realizó en microparcels para evitar contaminar el suelo del vivero donde fue instalado. Cada microparcels correspondió a una caja de plástica transparente de 40 x 28 x 30 cm enterrada 2/3 en el suelo del vivero. Las bandejas se llenaron con suelo del mismo vivero previamente esterilizado.

En cada microparcels se sembró 20 semillas en cada una de dos hileras de siembra espaciadas 10-12 cm. El inóculo fue producido sobre grano de avena (Viljoen *et al.* 1994) con mezcla de cepas 4641 y 6522, que se colocaron en el suelo en un surco ubicado entre los dos surcos de siembra. La cantidad de inóculo usado fue de 20 granos de avena por cada bandeja.

La siembra de todo el ensayo se efectuó la primera semana de Abril (2005). Los tratamientos de inoculación fueron a 3, 31, 65, 99 y 123 días desde la siembra, más un tratamiento donde se aplicó granos de avena no inoculados. Para cada tratamiento hubo 5 repeticiones (microparcels).

El estudio cubrió un período de 10 meses desde abril 2005 a enero 2006.

El ensayo se evaluó por recuentos semanales de plantas vivas y plantas con síntomas atribuibles a *F.circinatum* y corroborado por muestras llevadas a laboratorio para realizar aislamientos del hongo. Además, se realizó evaluaciones de la población de *F.circinatum* en el suelo, en tres de las cinco microparcels de cada tratamiento, sobre muestras de suelo tomadas a

ambos costados de las microparcels, esto es a más de 10 cm de distancia del lugar donde había sido colocado el inóculo.

Resultados y discusión

La emergencia se completó en un período de 9 semanas pero alcanzó un promedio de 73%, considerando muy alta ya que correspondía a una siembra de otoño. (Tabla 2.2.2.b-1). Las plantas ya emergidas en el ensayo sufrieron por heladas a inicios de agosto 2005, lo que obligó a eliminar algunas plantas muertas desde las microparcels, situación que se indica.

En el estudio no ocurrió damping off o ataques tempranos. Los primeros síntomas se comenzaron a observar desde inicios de octubre, bastante avanzado el crecimiento de las plantas. Los síntomas fueron cambio de color verde intenso a verde pálido y marchitamiento; posteriormente ocurre muerte de follaje.

El porcentaje de plantas vivas al final del estudio, que se mantuvo por 10 meses, varió entre 13,1 % y 38,2 % en los tratamientos de inoculación mientras que en el tratamiento sin inoculación la supervivencia al final del ensayo alcanzó a 75,4 % de las plantas consideradas emergidas (Tabla 2.2.2.b-1).

La presencia de *F.circinatum* en el suelo se confirmó en todas las microparcels en las que se tomó muestras así como su ausencia en el tratamiento sin inoculación. (Tabla 2.2.2.b-1) Dado que la muestra de suelo para determinar la presencia del patógeno en el suelo se tomó a más de 10 cm de distancia del punto de inoculación, puede considerarse que el patógenos crece o se redistribuye en un suelo de textura arenosa como el del vivero Carlos Douglas.

Tabla 2.2.2.b-1. Emergencia y supervivencia en estudio de inoculación cada 30 días y recuperación (ufc) del patógeno agregado.

Inoculación días desde siembra	Emergencia	Daño Helada	Supervivencia (%)	Ufc tratamiento
3	151	5	13,1	224
31	148	8	28,5	197
65	140	9	24,4	400
99	154	6	31,8	306
123	142	6	38,2	--
Sin inoculación	150	16	75,4	0

Al momento de levantar el ensayo, se tomó una muestra de plantas con síntomas (n=7) y otra de plantas (n=15) que no mostraban síntomas. Todas las plantas con síntomas y 30% del lote sin síntomas fueron positivas a presencia de *F.circinatum*, indicando que nuevas infecciones estaban en curso.

La capacidad de *F.circinatum* para producir enfermedad tardía sobre plantas en activo crecimiento en el vivero desde inóculo ubicado en el suelo queda demostrada así como la capacidad del patógeno de avanzar en el espacio suelo, sea porque las microconidias se redistribuyen con el agua en suelos de textura arenosa o porque el hongo avanza sobre raíces colonizadas.

Literatura consultada

Viljoen A., M.J. Wingfield y W.F.O. Marasas 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.dp. *pini* in South Africa. Plant Disease 78: 309-312.

4.13.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.13.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.2.c. Efecto del trasplante de plantas sanas de *P. radiata* a suelo inoculado con *F. circinatum*.

4.13.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La posibilidad que una planta sana se ubicare en plantación en un punto colonizado por *F.circinatum* es sin duda remota bajo la condición actual de ocurrencia de la enfermedad. Sin embargo, esta posibilidad es menos remota si se considera casos como jardines de setos (plantas madre) donde ocurre la enfermedad y las rotaciones son inferiores a 5 años. Además, desde un punto de vista estrictamente teórico es necesario conocer si plantas con desarrollo de raíces sanas son igualmente infectadas por el hongo establecido en el suelo.

Material y método

Suelo de arena no cultivado colocado en maceteros fue inoculado con una suspensión de esporas (cepas 4641 y 6255) en concentración de 5.000 esporas/ml. Luego se transplanto plantas a 1, 30, 60, 90 y 120 días desde la inoculación.

Las plantas a transplantar fueron producidas en invernadero (CPF Los Angeles). Los maceteros utilizados fueron mantenidos en el vivero Carlos Douglas, sobre el suelo. Cada tratamiento se aplicó a 10 plantas.

Resultados y Discusión

La muerte de plantas fluctuó alrededor de 50% de las plantas transplantadas. (Tabla 2.2.2.c-1) en todas las oportunidades de trasplante. Lo que deja en claro que *F.circinatum*, sobrevive y conserva su patogenicidad en el suelo. No se observa en el estudio diferencias en la incidencia de la mortalidad entre las épocas de trasplante.

Tabla 2.2.2.c-1. Porcentaje de plantas afectadas por *F.circinatum* en las distintas épocas de trasplante.

	Tiempo trasplante a días de la inoculación (días)	Muertas por <i>F.circinatum</i> (%)	Asintomáticas (%)
De las plantas sobrevivientes y sin síntomas, entre 10 y 30% presentaron <i>F. circinatum</i> en aislamientos realizados desde raíces.	1	60,0	10,0
	30	50,0	10,0
	60	50,0	30,0
	90	50,0	30,0
	120	46,2	15,4

4.14.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.14.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.3. Patogenicidad de *F. circinatum* en vivero con producción de planta de *P. radiata* a raíz cubierta.

2.2.3.a. Inoculación de semillas de *P. radiata* con *F. circinatum*.

4.14.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La dispersión del patógenos de los pinos *F.circinatum*, vía semillas infestadas e infectadas ha sido comprobada por varios autores (Barrows-Broadus y Dwinell 1985, Anderson 1986, Storer *et al.* 1998, Dwinell 1999, Dwinell y Fraedrich 1999), haciendo de este patógeno uno que puede sobrevivir y causar enfermedad tanto en ambientes de suelo como aéreo y capaz de ser diseminado vía semilla o utilizando vectores (Storer *et al.*1998, 1999) y capaz de encontrarse tanto en el agua (Wingfield *et al.* 1999) como en el aire (Blakeslee *et al.* 1979, Kuhlman *et al.* 1982; Schweigkofler *et al.* 2004).

Se realizó un estudio con el objetivo de obtener antecedentes sobre las enfermedades que *F.circinatum* podría producir cuando ocurre sobre semillas que son sembradas en substrato dispuesto en bandejas o tubos.

Material y método.

La semilla utilizada fue mantenida en remojo durante 48 horas, esterilizada superficialmente por inmersión en peróxido de hidrógeno durante 15 minutos. Se prefirió este procedimiento al que estaba prescrito originalmente, NaOCl al 1%, por considerarse de mayor eficacia.

La inoculación se efectuó por inmersión de las semillas durante una hora en suspensión de esporas de las cepas 6297 y 6522, (antes probadas en inoculación de semillas sembrada en suelo, Estudio 2.2.1.a) cada una en las concentraciones 10^4 y 10^6 conidias ml^{-1} La semilla testigo fue solamente sumergida en ADE.

Las semillas inoculadas fueron secadas al aire en vasos cristalizadores y mantenidas en frío hasta la siembra, que se efectuó en noviembre de 2004.

El sustrato de corteza de pino compostada fue esterilizado en dos días consecutivos (20 min, 100 kPa) y luego usado para llenar tubetes limpios, no usados anteriormente.

El ensayo fue evaluado por recuentos de emergencia y damping off.

Resultados y discusión.

La capacidad de las cepas en prueba para causar damping off es claramente diferente. La cepa 6297 en las dos concentraciones probadas no causa más de un 2% de damping off; la cepa 6522, por el contrario, produce hasta un 46% de mortalidad. (Tabla 2.2.3.a-1). Estos resultados son claramente similares a los obtenidos en un ensayo con las mismas cepas aplicadas a la semilla sembrada en suelo (Estudio 2.1.1.a), donde, sin embargo, todos los tratamientos inducen mayores porcentajes de damping off.

Prácticamente, todas las infecciones observadas hasta la primera evaluación a seis meses de la siembra (abril) ocurrieron posteriores a la emergencia como damping off aéreo. La enfermedad aparece primero en los cotiledones, en algunos casos alcanzando de inmediato el nudo del hipocotilo, destruyendo el punto de crecimiento y avanzando unos milímetros hacia abajo por el tallo y, en otros casos, afecta los cotiledones más lentamente y desde allí puede avanzar hacia el tallo cuando la planta ya ha iniciado su crecimiento secundario.

Tabla 2.2.3.a-1. Emergencia y muerte de plantas asociada a semilla inoculada y sembrada en substrato de corteza de pino.

Tratamiento	Emergencia	Muerte de plantas (%) a		
		Abril 2005	Julio 2005	Octubre 2005
6297 x 10 ⁴	54	1,9	5,6	5,6
6297 x 10 ⁶	55	0	0	1,8
6522 x 10 ⁴	54	18,5	27,8	35,1
6522 x 10 ⁶	54	46,3	68,5	87,1
Testigo	56	0	0	0

Los síntomas cambian completamente en la segunda y tercera evaluación. Aparece marcada clorosis en el follaje inferior en plantas, follaje que luego adquiere coloración rojiza. Estos síntomas van ascendiendo hasta que el ápice sufre decoloración y muerte. El proceso es lento y toma más de dos meses desde la clorosis inicial hasta la muerte de la planta. El crecimiento se detiene cuando la planta muestra los primeros síntomas.

Estos síntomas no aparecen descritos en la literatura consultada y no parecen corresponder a ataques sobre raíces ya que no hay marchitez generalizada. Esta es incipiente solamente sobre las acículas ya moribundas.

La dispersión del hongo sobre la semilla significa que, para producirse enfermedad en sistemas de producción a raíz desnuda, el patógeno pase al suelo y de allí infecte la raíz o tallo de la planta causando damping off de post-emergencia o ingrese desde la semilla en proceso de germinación directamente a la radícula causando damping off de pre-emergencia. Si la infección no pasa por el suelo, la penetración debería ocurrir en los cotiledones que en pino emergen protegidos por la testa de la semilla y esta es comúnmente colonizada (Estudio 2.2.1.a). Es probable que la sintomatología tardía observada en este ensayo corresponda a lesiones que se hayan originado en el tallo desde cotiledones infectados desde la semilla, lesiones que después ascienden por tejidos más externos del tallo.

La siembra a raíz cubierta de pino en el país se realiza casi exclusivamente sobre corteza de pino “compostada”, que es un substrato que por su granulometría no hace completo contacto con toda la superficie de la semilla, como la siembra sobre suelo. Puede postularse que el paso

de *F.circinatum* desde la semilla al sustrato de corteza y de allí al eje raíz-tallo debe ser menos frecuente que el mismo proceso en el suelo. Además, la modalidad de riego en los sistemas de producción a raíz cubierta y la textura del sustrato, hacen posible que contaminantes sobre la semilla, como son las esporas de hongos, pueden ser arrastradas en el agua de riego. La menor posibilidad de ingreso vía hipocotilo como el eventual escurrimiento del inóculo desde la semilla, permiten hipotetizar que en sistemas de producción a raíz cubierta el damping off asociado a *F.circinatum* debería ser un problema menor.

Literatura consultada

- Anderson R.L. 1986. New methods for Assessing Contamination of Slash and Loblolly Pine Seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Barrows-Broadus, J. y L.D. Dwinell. 1985. Branch Dieback and Cone and Seed Infection Caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a Loblolly Pine Seed Orchard in South Carolina. Phytopathology 75: 1104-1108.
- Blakeslee G.M., R.D. Dorset and S.W. Oak. 1979. Inoculum dispersal of the pitch canker fungus, *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*. Phytopathology 69: 1022.
- Dwinell D. 1999. Association of the Pitch Canker Fungus with Cones and Seeds of Pines. Pages 35-39 In: Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (Eds). Current and Potential Impacts of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterey. CA. USA.
- Dwinell L.D. y S.W. Fraedrich. 1999. Contamination of Pine Seed by the Pinch Canker Fungus. In: Landis T.D. y Barnett J.P. (Tech. coord) National Proceedings forest and conservation nursery associations-1998. Gen. Tech. Rep. 25. Asheville, NC. USDA FS Southern Research Station: 41-42.
- Gordon T.R., A.J. Storer and D.L. Wood. 2001. The Pitch Canker Epidemic in California. Plant Disease 85 (11): 1128-1139.
- Kuhlman E.G., S.D. Dianis and T.K. Smith. 1982. Epidemiology of Pitch Canker Disease in a Loblolly Pine seed Orchard in North Carolina. Phytopathology 72: 1212-1216.
- Storer A.J., Gordon T.R. and Clark S.L. 1998. Association of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* with Monterey pine seeds and seedlings in California. Plant Pathology 47: 649-656.
- Storer A.J., D.L. Wood and T.R. Gordon, 1999. Insect vectors of *Fusarium circinatum* in California and their potential for spread of pitch canker disease, pp 45-48 In: Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (Eds). Current and Potential Impacts of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop. Monterey. CA. USA.
- Schweigkofler W., K. O'Donnell and M. Garbelotto. 2004. Detection and Quantification of Airborne Conidia of *Fusarium circinatum*, the Causal Agent of Pine Pitch Canker, from Two California Sites by Using a Real Time PCR Approach Combined with a Simple Spore Trapping Method. Applied and Environmental Microbiology. 70: 3512-3520.
- Wingfield M.J., B.D. Wingfield, T.A. Coutinho, A. Viljoen, H. Britz y E.T. Steenkamp. 1999. Pitch Canker: A South African Perspective. Pp 65-69 In Devey, M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. eds. Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterrey Workshop, Monterey, CA. USA.

4.15.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.15.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.3.b. Inoculación del sustrato con *F. circinatum* en tubete.

4.15.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El hongo patógeno a pinos, *F.circinatum* ha sido observado atacando plantas producidas en sistemas de producción a raíz cubierta sobre sustrato de corteza de pino u otros (Carey y Kelly, 1994; Viljoen *et al.*, 1994; Wigfield, 1999) Sin embargo, estudios específicos sobre presencia de *F.circinatum* en sustrato son muy escasos. Huang y Kuhlman (1990) en un estudio sobre patógenos presentes en corteza de pino incluyen aislamientos de *F. moniliforme* var. *subglutinans* y *F. subglutinans* obtenidos de *P.palustris*. Ambas especies de *Fusarium* son considerados sinónimos de *F.circinatum* y los autores indican que *F moniliforme* var *subglutinans* inicia la infección desde semilla a los cotiledones siendo la más virulento de las cepas incluidas en el estudio.

Considerando que en el país *F.circinatum* ha sido determinado sobre plantas de semilla y de estacas producidas en bandejas o tubetes, se planteó un estudio para evaluar la ocurrencia de enfermedad asociada a inoculaciones del sustrato.

Material y método.

El ensayo se efectuó sobre sustrato comercial (Gromor™) esterilizado en autoclave e inoculado por dos métodos diferentes: a). por inmersión del sustrato durante 2-3 minutos en una suspensión de esporas, de las cepas 6522 y 4641, mantenida en una gamella, luego el sustrato fue tamizado y colocado en los tubetes. En el caso de inoculación de estacas, se extrajo el pan de raíces se sumergió en la suspensión de esporas. La suspensión en la gamella se preparó colocando 5 mL de una suspensión con concentración $1 \cdot 10^5$ conidias mL^{-1} por cada tubete a ser inoculado, resuspendida en 0,2 L de agua. b). por riego con 5 mL de suspensión de esporas de las cepas 4641 y 6522 en concentración de $1 \cdot 10^5$, aplicado con pipeta al sustrato en el tubete. En el ensayo con estacas se agregó un tratamiento adicional. c). de semi-inmersión que consistió en colocar los tubetes con corteza, en vasos precipitado de 600 mL de capacidad, inmersos hasta la mitad de su altura, durante 3-4 minutos, en una suspensión de esporas.

La semilla utilizada fue mantenida en remojo por 48 horas, luego esterilizada superficialmente por inmersión en peróxido de hidrógeno (20 min.), secada y mantenida en frío hasta la siembra. Las estacas ya enraizadas pertenecían a la familia PO 0007134, propiedad de Forestal Mininco. La unidad experimental fue un tubete y el número de repeticiones de 22.

El estudio presenta dos cambios en la metodología con respecto a lo programado; uno es el cambio de método de inoculación del sustrato vía aspersión de una suspensión de esporas por inmersión del sustrato en la suspensión de esporas. Este cambio debió hacerse porque la aspersión estaba diseñada sobre el sustrato extendido sobre mesón para lograr uniformidad en la distribución del inóculo, y este sistema es inaplicable en el espacio disponible en invernadero.

El segundo cambio se refiere a la calidad de las estacas a inocular, las estacas enraizadas que se establecían en la metodología significan ya algún crecimiento de raíces, lo que impediría desagregar el pan de raíces para exponerlas y tratarlas con cloro y agua, para luego volver a colocar este sistema de raíces en otro tubete, por lo que se debió tratar el substrato sin esterilizar superficialmente el sistema radical.

Resultados y discusión

Siembra sobre substrato inoculado.

La emergencia en los tratamientos inoculados fue muy baja en promedio, 19,3% comparada con la emergencia promedio de los testigos (84,1%), producto de un severo ataque de damping off de pre-emergencia. Todas las plantas emergidas fueron infectadas y muertas por *F.circinatum* antes de una semana de emergidas (Tabla 2.2.3.b-1 y Figura 2.2.3.b-1).

Tabla 2.2.3.b-1. Emergencia y damping off en los tratamientos de inoculación de corteza y siembra.

Tratamiento	Emergencia % sobre siembra	Damping off	
		(número)	(%)
6522 riego	18,2	4	100
6522 inmersión	27,2	6	100
4641 riego	13,6	3	100
4641 inmersión	18,2	4	100
Testigo riego	81,8	0	0
Testigo inmersión	86,4	0	0



Figura 2.2.3.b-1. Bandeja con los tratamientos con damping off.

Estos resultados son concluyentes en cuanto a que la corteza puede servir como fuente de inóculo para infecciones de *F.circinatum* sobre plantas de pino originadas de semilla.

Estacas establecidas e inoculación del sustrato.

Los síntomas en este caso comenzaron a manifestarse a la sexta semana desde la inoculación. Hubo dos tipos generales de síntomas, en algunas plantas ocurrió marchitez y posterior secamiento de las acículas y, en otras, se presentó un reblandecimiento de la corteza en la zona del cuello de la planta que finalmente conduce a marchitamiento del tercio superior.

Tabla 2.2.3.b-2. Mortalidad acumulada, en porcentaje, de plantas en el estudio de inoculación del pan de sustrato de estacas de pino radiata.

Tratamientos	Mortalidad acumulada de plantas (%)			
	14 Junio	1 Julio	Agosto 2	Octubre 24
4641 riego	9	22,7	50,0	50,0
6522 riego	9	31,8	50,0	54,5
6522 inmersión	45,4	45,4	59,0	62,2
4641 inmersión	54,5	62,2	90,9	95,4
6522 semi inmersión	0	0	4,5	4,5
4641 semi inmersión	0	0	0	9

Inicialmente, la inoculación del pan de raíces por inmersión ocasiona mayor mortalidad de estacas que la que ocurre cuando el substrato es inoculado simulando un riego con agua contaminada. Al término del ensayo, sin embargo, la diferencia se mantiene solamente para la cepa 4641. La inmersión de solamente el extremo inferior del tubete no ocasiona mortalidad importante (tratamiento semi-inmersión) al término del estudio.

Literatura consultada

- Carey, W.A. and Kelly, W.D. 1994. Late season mortality in longleaf pine nurseries caused by *Fusarium subglutinans*. *Phytopathology* 84: 1096.
- Huang, J.W. and Kuhlman, E.G. 1990. Fungi associated with damping off of slash pine seedlings in Georgia. *Plant Disease* 74: 27-30.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J. and Marasas, W.F.O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.
- Wingfield, M.J. 1999. Opinion, pp. 56 In. Davey, M.E., Matheson, A.C. and Gordon, T.R. (eds). Current and potential impact of pitch canker on radiata pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. to 3 Dec.1998.

4.16.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*

4.16.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.4. Infección tardía de plantas de *P. radiata* con *F. circinatum*

4.16.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La infección de plantas de pino radiata con *F.circinatum* puede ocurrir en el vivero, especialmente hacia el final del período de viverización, a través de heridas pequeñas o microheridas. Las microheridas pueden originarse por las labores propias del vivero, como poda aérea, simple manipulación a la cosecha, como desprendimiento de acículas, o abrasiones en el tallo y, ocasionalmente por insectos. Estas heridas serían la avenida de entrada del patógeno a la planta, la que manifestaría los síntomas de la infección meses después ya plantada. Por ejemplo, Kelly y Williams (1982) usan las heridas que causa el desprendimiento de acículas vecinas a la yema terminal y Kuhlman (1987), las producidas por la extracción de fascículos contiguos en la rama. Otros autores simulan el daño de insectos inoculando suspensión de esporas de *F.circinatum* sobre heridas causadas por aguja hipodérmica o de disección. (Kuhlman *et al.*, 1982; Barrows-Broadus y Dwinell, 1983; Kuhlman 1987; Runion y Bruck 1988).

En este estudio se busca comprobar si microheridas ubicadas en la base del tallo de plantas pueden ser vía de entrada de *F.circinatum* a las plantas de pino.

Material y método

Las plantas usadas fueron producidas en un vivero libre de *F.circinatum* (Vivero PROPLANT) y mantenidas en observación por posible aparición de síntomas durante 3 meses en invernadero antes de ser inoculadas.

Las plantas se inocularon por dos procedimientos:

- a) Modificación del método usado por Barrows-Broaddus y Dwinell (1984), en cuanto las cinco heridas por punción con aguja hipodérmica en la base del tallo fueron hechas antes de depositar 20 μL de una suspensión de esporas (1×10^5) y no después de depositar la gota de inóculo. Una vez inoculada la planta, el área inoculada fue cubierta con parafilm.
- b) Extrayendo con pinza 5 acículas vivas en la parte inferior de un lado del tallo y depositando el inóculo sobre las heridas producidas. Una vez inoculada la planta, el área inoculada fue cubierta con parafilm.

El inóculo usado en el estudio fue preparado con las cepas 6597 y 6522 de *F.circinatum*. Los tratamientos fueron dos cepas y dos modos de inoculación para cada cepa, más los respectivos testigos. La unidad de observación fue la planta y el número de repeticiones fue de 20 plantas por tratamiento.

Las plantas testigo para ambos procedimientos de inoculación fueron tratadas con agua destilada esterilizada (ADE).

Resultados

La incidencia y severidad de la enfermedad producida difieren notoriamente entre las cepas probadas (Tabla 2.2.4-1). La cepa 6522 produjo 100% de mortalidad en ambos métodos de inoculación mientras que la cepa 6297 no produjo síntomas de ningún tipo que pudieran asociarse a infecciones por el patógeno inoculado. Este resultado evidencia la variación en patogenicidad de las cepas de *F.circinatum*.

Tabla 2.2.4-1. Resultados de inoculación por microheridas del tallo en plantas de pino de 11 meses.

Tratamiento	Plantas inoculadas (número)	Plantas con síntoma (número)
6297 Hipodérmica	20	0
6297 Acícula	20	0
6522 Hipodérmica	20	20
6522 Acícula	20	20
Testigo Hipodérmica	20	0
Testigo Acícula	20	0



Figura 2.2.4-1. Efecto de cepas 6297 y 6522 inoculadas vía microheridas (H) y extracción de acículas (A) en plantas de pino de 11 meses (TA y TH, testigos).



Figura 2.2.4-2. Signos presentes en plantas inoculadas.

Las plantas inoculadas con la cepa 6522 comenzaron a mostrar síntomas de marchitamiento de los tejidos más recientes a treinta y cinco días de la inoculación, síntoma que se extendió luego en todas las acículas, las que finalmente se secaron tomando un color rojizo y mantuvieron en la planta. Los esporodocios comenzaron a aparecer antes que las plantas presentaran el follaje muerto y permanecieron por semanas después de que las plantas murieran.

Literatura consultada

- Barrows-Broadus, J. and L.D. Dwinell. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology* 73: 882-889.
- Barrows-Broadus, J. and L.D. Dwinell. 1984. Variation in Susceptibility to the Pitch Canker Fungus Among Half-Sib and Full-Sib Families of Virginia Pine. *Phytopathology* 74: 438-444.
- Kelly, W.D. and J.C. Williams. 1982. Incidence of pitch canker among clones of loblolly pine in seed orchards. *Plant Disease* 66: 1171-1173.
- Kuhlman, E.G. 1987. Effects of inoculation treatment with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on dieback of loblolly and slash pine seedlings. *Plant Disease* 71: 161-162.
- Kuhlman, E.G., S.D. Dianis and T.K. Smith. 1982. Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard in North Carolina. *Phytopathology* 72: 1212-1216.
- Runion, G.B. and Bruck, R.I. 1988. The effects of thiabendazole on *Fusarium subglutinans*, the causal agent of pitch canker on loblolly pine. *Plant Disease* 72: 297-300.

4.17.NOMBRE DE LA META.

META 2

2.2. Estudios de patogenicidad de *F. circinatum*.

4.17.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

2.2.5. Inoculación de plantas de *P. radiata* mayores de 4 años con *F. circinatum*.

2.2.5.a. Ensayo preliminar de inoculación de plantas de *P. radiata* mayores de 4 años con *F. circinatum*.

2.2.5.b. Ensayo de corroboración de un sistema de inoculación de *P. radiata* mayor a 4 años con *F. circinatum*.

4.17.2.AVANCE A LA FECHA

Estudios suspendidos por ser incompatible con la Resolución de Control Obligatorio de *Fusarium circinatum*, pero se realizó los siguientes estudios para aumentar el conocimiento del patógeno en esta línea.

A.- Patogenicidad de *Fusarium circinatum* (Nirenberg y O'Donnell) en plantas de *Pinus radiata* D.Don de 18 meses de edad mantenidas en contenedor.

Introducción.

Este estudio corresponde al primer estudio de patogenicidad de cepas de *F.circinatum* aisladas desde pino radiata en Chile y sirvió como tema de Memoria de Título al Ingeniero Forestal Señor Omar Arévalo Vera. Se incluye en este informe por cuanto sirve a consolidar la información sobre el patógeno.

El objetivo del estudio es probar diferentes métodos de inoculación de dos cepas de *F.circinatum* sobre plantas menores de dos años.

Material y método

Todas las pruebas se realizaron con dos aislamientos o cepas 4641 y 6297. Estos aislamientos fueron obtenidos desde canchales producidos en el cuello plantas de pino radiata preparadas para setos, mantenidas en bolsa con substrato de corteza y que presentaban síntomas de marchitamiento.

Las plantas de *P.radiata*, de 18 meses de edad, correspondían a plantas producidas en bloques de poliestireno expandido, sobre substrato de corteza compostada de pino, en el vivero Los Quillales, Quillón, VIII Región, libre de *F.circinatum*. Las plantas fueron llevadas a las instalaciones de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, en Concepción, donde, antes de ser inoculadas, se mantuvieron al ambiente durante dos semanas sobre mesones con riego por aspersión. Todas las plantas presentaban algún grado de clorosis incipiente, especialmente en el follaje inferior, probablemente asociada a deficiencias nutricionales, pero tanto el follaje como el tallo se observaba libres de síntomas o signos de patógenos.

Para la inoculación se conformaron 3 grupos de plantas de acuerdo a los tratamientos de inoculación:

- a) inoculación en la base del tallo por dos sistemas: i). extracción de un área de corteza (25 mm²) y colocación de un parche de micelio de un cultivo en PDA del patógeno y ii). incisión en bisel de la corteza con adición de suspensión de esporas;
- b) inoculación sobre corte del meristema subapical, i). con parche de micelio del patógeno sobre PDA y ii). incisión más inyección de suspensión de esporas en el corte;
- c) inoculación en la base del tallo más otra lesión en la base o corte de meristema apical. Cada grupo incluye los respectivos testigos originando los siguientes tratamientos:
 - a) Inoculación en la base del tallo.
 1. extracción de corteza + parche de agar (testigo).
 2. extracción de corteza + parche de cultivo cepa 6297.
 3. extracción de corteza + parche de cultivo cepa 4641.
 4. incisión en corteza + inyección agua destilada estéril (testigo).
 5. incisión en corteza + inyección suspensión de esporas cepa 6297.
 6. incisión en corteza + inyección suspensión de esporas cepa 4641.
 - b) Inoculación en el ápice decapitado.
 7. corte e inoculación con parche de cultivo cepa 6297.
 8. corte y colocación de agar solo (testigo).
 9. corte e inoculación con parche de cultivo 4641.
 10. corte e inyección con suspensión esporas cepa 6297.
 11. corte e inyección con suspensión esporas cepa 4641.
 12. corte e inyección con agua destilada estéril (testigo).

c) Sistema combinado de inoculación.

13. incisión en la base + inyección esporas cepa 4641 + lesión + corte ápice.
14. incisión en la base + inyección esporas cepa 6297 + lesión.
15. estigo absoluto.
16. incisión en la base + inyección con agua + lesión (testigo).
17. extracción de corteza + adición trozos cultivo cepa 6297 + lesión.

El inóculo usado correspondió a cultivos monospóricos en PDA de las cepas CDS 4641 y CDS 6297 y fue siempre el mismo para todos los sistemas de inoculación. La suspensión de inóculo (micelio y conidias) fue preparada agregando 10 ml de agua destilada esterilizada a un disco de Petri donde crecía el patógeno y raspando con bisturí el micelio superficial. La concentración de conidias utilizadas para este sistema de inoculación fue de 9.700 mL^{-1} .

Las inyecciones de 0,3 ml por planta se realizaron con aguja hipodérmica esterilizada.

Las inoculaciones en la sección apical de las plantas se hicieron previa decapitación de cerca de 1 pulgada del ápice, realizando una incisión de 3 mm para inocular o inyectando directamente al centro del corte según correspondiera.

Los tallos inoculados fueron cubiertos con “parafilm” durante 48 horas, en el segmento herido.

La unidad de trabajo fue la planta. El número de plantas inoculadas por tratamiento fue variable entre 7 y 10, según el número de plantas vivas por hilera de las bandejas almacigueras utilizadas.

Las plantas inoculadas fueron mantenidas al exterior, sobre mesones con riego por aspersión y observadas semanalmente por presencia de síntomas.

Los resultados de las inoculaciones en la base del tallo se evaluaron de acuerdo a la siguiente escala de notas (James *et al.* 1989):

1. Plantas sanas.
2. Plantas con clorosis o marchitamiento en menos del 50% del follaje.
3. Plantas con clorosis sobre 50% del follaje o con necrosis menor de 50% del tallo.
4. Plantas con necrosis sobre 50%.
5. Plantas muertas.

Esta escala de notas se utilizó para calcular un Índice de Severidad de la Enfermedad (ISE), que corresponde a la suma de cada grado por el número de plantas en el grado y dividido por el total de plantas en el tratamiento.

En plantas que solamente presentaban clorosis o necrosis parcial, por ejemplo aquellas en grados 2 o 3 de la escala, se examinó y midió la longitud de tallo con necrosis asociada al corte de inoculación.

Las inoculaciones en el ápice se evaluaron por la longitud de tallo muerto.

Todas las plantas muertas o moribundas se observaron bajo microscopio estereoscópico por presencia de esporodoquios que permitieran identificar al hongo como *F. circinatum*. En plantas que quedaron vivas (grados 1, 2 y 3), así como en una muestra de plantas testigo, se extrajo trozos de tallo desde el borde del área necrosada, o de la lesión inicial, que fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio (0,5% por 1 min.) y sembrados en PDA para reaislar el patógeno inoculado.

Las inoculaciones se realizaron el 14 de diciembre de 2001 y las evaluaciones finales el 19 de marzo de 2002.

Resultados.

En este ensayo, que fue el primero efectuado (diciembre de 2001) se usó el primer traspaso de los aislamientos en PDA y, ambas cepas en ensayo fueron igualmente patógenas. Ambas causaron mortalidad de plantines de pino radiata de 18 meses de edad cuando fueron inoculadas en la base del tallo, sea por herida en la corteza y colocación de micelio de cultivo puro de *F.circinatum* (Tabla 2.2.5-1 tratamientos 2 y 3) o cuando se inocularon por inyección una suspensión de esporas (Tabla 2.2.5-1, tratamientos 5 y 6, y Figura 2.2.5-2).

Tabla 2.2.5-1. Mortalidad y severidad del ataque en plantines de pino radiata inoculados en la base del tallo con *F. circinatum*.

Tratamientos en la base del tallo	Plantas (núm.)	Severidad (Plantas/grado)					Rango de Severidad	Mortalidad (%)	ISE
		1	2	3	4	5 *			
1. corte corteza+agar solo	6	6	--	--	--	--	1-1	0	1,0
2. corte c.+ 6297 micelio	7	2	--	--	1	4	1-5	57	3,7
3. corte c.+ 4641 micelio	5	2	--	1	--	2	1-5	40	3,0
4. inyección + agua	7	7	--	--	--	--	1-1	0	1,0
5. inyec. + 6297 suspens.	6	2	1	1	--	2	1-5	33	2,8
6. inyec. + 4641 suspens.	6	2	1	1	--	2	1-5	33	2,8
13. inyec.+ 4641 suspens. + lesión +decapitación	8	1	--	--	--	7	1-5	88	4,5
14. inyec.+ 6297 suspens. + lesión	11	1	1	--	2	7	1-5	64	4,2
15. testigo absoluto	4	4	--	--	--	--	1-1	0	1,0
16. inyección + agua + lesión	7	7	--	--	--	--	1-1	0	1,0
17.corte+ 6297 micelio + lesión	5	1	--	--	1	3	1-5	60	4,0

* Las plantas en grado 5 son plantas muertas y presentaban normalmente esporodocios o “florecimientos” de esporas en la zona vecina a la inoculación.



Figura 2.2.5-2. Muerte de plantines con inoculación en la base del tallo.

El índice de severidad (ISE) para ambas cepas fue sensiblemente similar en cada sistema de inoculación probado: 3,7 y 3,0 cuando se usó parche de micelio, y 2,8 para ambas cepas cuando se usó inyección de suspensión de esporas como sistema de inoculación. Aún cuando los tratamientos 13 y 14 no son exactamente similares, la severidad de ambas cepas es sensiblemente similar.

La severidad de la enfermedad parece aumentar cuando se debilita la planta con otra lesión (Tabla 2.2.5-1, tratamientos 13, 14 y 17), alcanzándose valores de 4 o sobre 4 que indican alta mortalidad en esos tratamientos.

Tabla 2.2.5-2. Longitud de lesiones necróticas asociadas al punto de inoculación en la base del tallo con *F. circinatum* medido en plantas grados 1 y 2, al final del ensayo.

Tratamientos en la base del tallo	Plantas evaluadas (núm.)	Longitud de la lesión (mm.)							Promedio lesión (mm)
		1	2	3	4	5	6	7	
1. corte corteza+agar solo	6	3	4	5	0	0	3		2,5
2. corte c.+ 6297 micelio	2	25	30						27,5
3. corte c.+ 4641 micelio	2	5	15						10,0
4. inyección + agua	7	0	0	8	1	2	0	0	1,6
5. inyec. + 6297 suspens.	3	30	18	11					19,7
6. inyec. + 4641 suspens.	2	34	24						29,0
13. inyec.+ 4641 suspens. + lesión +decapitación	1	27							27,0
14. inyec.+6297 suspens. + lesión	2	25	21						23,0
15. testigo absoluto	--	--	--	--	--	--	--	--	--
16. inyección+ agua +lesión	7	2	2	1	1	0	1	1	1,1
17.corte+ 6297, micelio+ lesión	1	47							47,0

Aun cuando *F. circinatum* no causó la muerte en todas las plantas inoculadas, el hongo indujo formación de canchales en torno al punto de inoculación en todas las plantas que permanecieron vivas al levantarse el ensayo (Tabla 2.2.5-2).

La inoculación en la parte superior del tallo después de la ablación del meristema apical produjo una lesión necrótica (cancro difuso) hacia la parte inferior del tallo, pero sin causar mortalidad (Figura 2.2.5-3). Las dos cepas probadas se comportaron de modo similar (Tabla 2.2.5-3).

Tabla 2.2.5-3. Longitud de lesiones en la parte distal del tallo de pino radiata inoculado con *F.circinatum* sobre un corte apical.

Tratamientos inoculación en corte de ápice.	Plantas (núm.)	Longitud tallo superior con necrosis (mm)							Promedio Lesión (mm)
		1	2	3	4	5	6	7	
7. corte + 6297 micelio	6	45	25	25	15	30	15	--	26
8. corte + agar solo (testigo)	5	0	0	15	0	0	--	--	3
9. corte + 4641, micelio	5	10	50	55	10	35	--	--	32
10. inyección + 6297	7	15	15	15	20	90	20	15	27
11. inyección + 4641	5	50	15	15	40	25	--	--	29
12. inyección agua (testigo)	6	0	0	0	0	0	0	--	0

En este grupo de tratamientos, una planta testigo, inoculada con trozo de agar solo, mostró necrosis (Tabla 2.2.5-3, planta 3), situación que debió obedecer al uso herramientas contaminadas al realizar los cortes u otras manipulaciones.



Figura 2.2.5-3. Necrosis en la parte superior del tallo en plantines inoculados con micelio (cepa 6297).

Tabla 2.2.5-4. Re-aislamientos de *F. circinatum* desde plantas inoculadas (plantas en grados 1 y 2 para aquellas plantas inoculadas en la base del tallo).

Tratamientos	Aislamientos		
1. Corte corteza base tallo + agar solo (testigo)	0	0 + Ss	--
2. Corte corteza base tallo + cultivo 6297	Fc	Fc + Ss	--
3. Corte corteza base tallo + cultivo 4641	Fc	Fc + Ss	--
4. Inyección base tallo + agua (testigo)	0	0 + Ss	--
5. Inyección base tallo + 6297 suspensión espora	Fc	Fc + Ss	Fc + Ss
6. Inyección base tallo + 4641 suspensión espora	Fc + Ss	Fc + Ss	--
7. Corte tallo superior + 6297 cultivo	Fc	Fc	--
8. Corte tallo superior + agar solo (testigo)	Fc	0 + Ss	--
9. Corte tallo superior + 4641 cultivo	0	Fc	--
10. Corte tallo superior + inyección 6297	Fc + Ss	Fc	--
11. Corte tallo superior + inyección 4641	Fc	Fc	--
12. Corte tallo superior + inyección agua (testigo)	0	0	--
13. Inyección base + 4641 + lesión + corte ápice	Fc + Ss	--	--
14. Inyección base + 6297 + lesión	Fc	Fc	--
15. Testigo sin intervenir	--	--	--
16. Inyección base + agua + lesión (testigo)	0	0 + Ss	--
17. Corte corteza base + 6297 + lesión	Fc	--	--

Fc = *Fusarium circinatum*; Ss = *Sphaeropsis sapinea*; 0 = sin crecimiento

En todos los tratamientos con inoculación de *F.circinatum*, el patógeno fue reaislado desde las lesiones producidas. En las plantas donde se produjo esporodoquios (Figura 2.2.5-4), la identificación se realizó por características de las conidias y presencia de polifialides. Además, desde varias de las plantas utilizadas en las pruebas y que aparecían sanas, sin síntomas de enfermedad, excepto una ligera clorosis, (Tabla 2.2.5-4, tratamientos 1, 4 y 16) se obtuvo crecimiento de *Sphaeropsis sapinea* en el medio PDA utilizado. En los tratamientos inoculados con *F.circinatum* también se obtuvo la presencia conjunta de *F.circinatum* y *S.sapinea* indicando la presencia anterior en las plantas de éste último patógeno que puede actuar como endófito (Figura 2.2.5-5).



Figura 2.2.5-4. Presencia de resinación y esporodoquio en la base del tallo.



Figura 2.2.5-5. Aislamientos en PDA donde se observa *S. sapinea* (color oscuro) y *F. circinatum* creciendo desde el mismo trozo de tejido.

Los resultados obtenidos indican similar comportamiento de las cepas de *F. circinatum* usadas como inóculo. Ambas cepas producen enfermedad inoculadas en la base del tallo o en corte sub-apical aplicados tanto como micelio o como suspensión de esporas.

B.- Ensayo preliminar de inoculación de plantas de *P. radiata* mayores de 4 años con *F. circinatum*.

Introducción

El hongo *F. circinatum* causante del cancro resinoso de los pinos (pitch canker) fue determinado en el país sobre plantas madres de pino radiata en formación, mantenidas en bolsas, y en viveros (Wingfield *et al.* 2001). El patógeno no ha sido determinado en plantaciones en Chile, excepto en plantaciones recién establecidas donde mueren algunas plantas cuya infección se había originado en vivero donde la presencia de *F. circinatum* había sido determinada.

Puesto que es importante conocer si cepas aisladas de plantas en bolsa son igualmente patógenas en plantas de más edad se realizó este estudio donde se inocula de diferentes modos y en diferentes sitios de plantas de 6 años.

Material y método.

Todos los estudios se realizaron con los mismos dos aislamientos o cepas (strains): CDS 4641 y CDS 6297. Estos aislamientos fueron obtenidos desde canchales producidos en el cuello plantas de pino radiata preparadas para setos, mantenidas en bolsa con substrato de corteza y que presentaban síntomas de marchitamiento.

Los primeros aislamientos fueron hechos en PDA (agar papa dextrosa), luego, desde esos cultivos se preparó cultivos monospóricos que se traspasaron a PDA para identificación e inoculación y en SNA (Syntetische Nährstorfer Agar) para ser conservados a 6°C - 8°C grados.

Resultados de estudios de patogenicidad en pinos de 6 años.

Este estudio se realizó en plantas de pino radiata de 6 años, originalmente formadas, mantenidas y usadas como setos para producir brotes usados en la crianza de *Rhyacionia buoliana*. Las plantas, establecidas sobre platabandas con 4 hileras de plantación espaciadas a 0,5 m entre hileras y a similar distancia sobre la hilera, se habían dejado crecer normalmente desde hacía dos temporadas pero aun se mantenían bajas y ramificadas y en buenas condiciones generales.

Los tratamientos de inoculación en este estudio fueron combinaciones entre dos cepas de *F.circinatum* (números 4641 y 6297), con 2 sistemas de inoculación (parche de cultivo puro del patógeno y suspensión de esporas) y 4 sitios de inoculación (base del tallo, rama, rama podada y ápice).

El número de tratamientos, incluido los testigos, fue de 24 (Tabla 2.2.5-5) y el número de repeticiones fue de 7 árboles.

Para inocular con trozos o parches de cultivo puro se sacaba primero un área de la corteza de la planta con tubo sacabocado de 9 mm de diámetro, y luego un área igual desde un cultivo puro que se colocaba reemplazando la corteza extraída, con el micelio contra la madera. De inmediato se cubría la zona inoculada con parafilm.

La suspensión de esporas se preparó colocando 10 ml de agua destilada esterilizada sobre un cultivo en PDA y soltando las conidias con pasadas de bisturí. Para cada planta se usó 0,3 ml de suspensión cuya concentración alcanzaba a 15000 esporas ml⁻¹ y, para colocarla, se realizaba una incisión en bisel en la corteza, que se cubría luego con parafilm.

Tabla 2.2.5-5. Tratamientos de inoculación en el estudio.

Nº	Cepa	Sitio	Procedimiento
1	4641	Tallo	Sacabocado
2	4641	Rama	Sacabocado
3	4641	Rama poda	Sacabocado
4	4641	Ápice	Sacabocado
5	Testigo	Tallo	Sacabocado
6	Testigo	Rama	Sacabocado
7	Testigo	Rama poda	Sacabocado
8	Testigo	Ápice	Sacabocado
9	4641	Tallo	Jeringa
10	4641	Rama	Jeringa
11	4641	Rama poda	Jeringa
12	4641	Ápice	Jeringa
13	Testigo	Tallo	Jeringa
14	Testigo	Rama	Jeringa
15	Testigo	Rama poda	Jeringa
16	Testigo	Ápice	Jeringa
17	6297	Tallo	Sacabocado
18	6297	Rama	Sacabocado
19	6297	Rama poda	Sacabocado
20	6297	Ápice	Sacabocado
21	6297	Tallo	Jeringa
22	6297	Rama	Jeringa
23	6297	Rama poda	Jeringa
24	6297	Ápice	Jeringa

La inoculación en la base del tallo se realizó a una altura entre 20 y 30 cm desde el suelo, bajo la primera inserción de ramas, con diámetro de tallo variable entre 2, 5 y 4 cm. La inoculación

en rama se realizó en un punto a unos 10 cm desde su inserción en el fuste. La inoculación sobre rama podada se realizó dejando un muñón de la rama suficiente para ser inoculado. La inoculación en el ápice se realizó en la base de éste, siempre en tejidos no lignificados de la temporada.

Las plantas testigo recibieron inoculación con trozos de agar solo o con inyección de agua destilada esterilizada.

En todos los casos las inoculaciones de un tratamiento se completaban en todas sus repeticiones antes de inocular el tratamiento siguiente.

El diseño en este ensayo fue de bloques al azar con 7 repeticiones, siendo el bloque o repetición una hilera de plantación. La unidad experimental fue la planta.

El ensayo se inoculó el 5 de mayo de 2002 y se mantuvo en observación semanal hasta febrero de 2003 cuando se procedió a cortar todas las plantas con inoculación.

Toda planta o parte de ella (rama o ápice) con síntomas fue retirado del ensayo, cortado, colocado en bolsas plásticas cerradas y transportado a laboratorio en Chillán donde se procedía a su evaluación y, si se considera factible la obtención de esporodoquios, los trozos afectados se mantenían en cámara húmeda, de otro modo el material se quemaba.

Una muestra de tejidos necrosados era llevada al laboratorio (CDS) en forma separada, en bolsas de papel, para el re-aislamiento del patógeno en PDA.

Resultados

Este ensayo tiene 24 tratamientos. Para mejor entendimiento de los resultados, éstos se presentarán separados por sitio de inoculación y luego en una tabla resumen.

Los primeros síntomas observados en este ensayo se produjeron en los tratamientos de inoculación en el ápice líder. Dado que en este ensayo en terreno no se podía correr el riesgo de esperar la muerte de las plantas o sus partes y la subsecuente formación de esporodoquios, los ápices fueron cortados en cuanto se presentó marchitamiento, además de canchales incipientes o resinación (Figuras 2.2.5-6 y 2.2.5-7).



Figura 2.2.5-6. Síntomas de marchitamiento en inoculaciones con *F.circinatum* en el ápice de plantas de pino de 6 años.



Figura 2.2.5-7. Síntomas de resinación y canchros en inoculaciones con *F.circinatum* en el ápice de plantas de pino de 6 años.

Tabla 2.2.5-6. Resultado de inoculación de ápices de plantas de pino radiata de 6 años con *F.circinatum*. Síntomas de marchitamiento (M), resinación (R) y cancro (C).

Trat. N°	Tratamiento descripción		Resultados para cada repetición						
	Cepa	Método inoculación	1	2	3	4	5	6	7
T4	4641	sacabocado	MRC	MRC	MR	MRC	MRC	MRC	MRC
T12	4641	jeringa	MRC	MRC	MRC	MRC	MRC	MRC	MRC
T20	6297	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0
T24	6297	jeringa	0	0	0	0	0	MRC	MRC
T8	Testigo	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0
T16	Testigo	jeringa	0	0	0	0	0	0	0

El síntoma de resinación en la zona vecina, generalmente superior, al punto de inoculación fue el primer síntoma en manifestarse en la tercera semana de noviembre de 2002, dos semanas más tarde se observó obvio marchitamiento de los brotes en los ápices inoculados en la base. El síntoma de marchitamiento comenzó a observarse desde la primera semana de diciembre de 2002 y hasta la segunda semana de enero 2003. Todos los ápices con síntomas fueron cortados y retirados del sitio del ensayo.

El comportamiento de las cepas probadas es diferente. Mientras la cepa 4641 presenta 100% de las plantas inoculadas con síntomas del ataque fungoso, la cepa 6297 solo entrega 14% de respuestas con síntomas (Tabla 2.2.5-6). En las plantas testigo no se observó presencia de síntomas.

Tabla 2.2.5-7. Resultado de inoculación con *F. circinatum* en ramas superiores de plantas de pino radiata de 6 años. Síntomas de resinación (R) y cancro (C)

Trat.	Tratamiento descripción		Resultados para cada repetición (7)						
	Cepa	Método inoculación	1	2	3	4	5	6	7
T2	4641	sacabocado	0	RC	0	RC	R	RC	RC
T10	4641	jeringa	R	RC	RC	RC	RC	0	RC
T18	6297	sacabocado	0	RC	R	0	0	R	0
T22	6297	jeringa	0	0	RC	0	0	0	RC
T6	Testigo	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0
T14	Testigo	jeringa	0	0	0	0	0	0	0

El síntoma primero observado, tercera semana de noviembre, es de resinación, con presencia de un ligera depresión en la rama en la zona de inoculación; esa área aparecerá luego con la corteza muerta (Figura 2.2.5-8). No se observó en ningún caso marchitez en las ramas inoculadas (Figura 2.2.5-9), aun cuando al cortar la rama y examinar el cancro toda la sección del tallo en la zona vecina aparece embebido en resina. Los canchros que se observaron en las ramas no fueron siempre del tipo limitado, observándose algunos casos de canchros difusos (Figura 2.2.5-10).

El comportamiento de las cepas en cuanto a su patogenicidad es diferente. La cepa 4641 induce respuesta en 79% de los casos y la cepa 6297 solamente en 36% de las plantas inoculadas en una rama. (Tabla 2.2.5-7). No hay presencia de síntomas en plantas testigo.



Figura 2.2.5-8. Presencia de resinación en ramas de pino radiata inoculadas con *F. circinatum*.



Figura 2.2.5-9. Crecimiento normal en ramas inoculadas en la base con *F. circinatum*.



Figura 2.2.5-10. Cancro y área embebida en resina en ramas de pino radiata inoculadas con *F. circinatum*.

Tabla 2.2.5-8. Resultado de inoculación con *F. circinatum* en ramas superiores podadas de plantas de pino radiata de 6 años. Síntomas de resinación (R) y cancro (C)

Trat. N°	Tratamiento descripción		Resultados para cada repetición (7)						
	Cepa	Método inoculación	1	2	3	4	5	6	7
T3	4641	sacabocado	R	R	R	0	0	RC	R
T11	4641	jeringa	R	0	0	0	0	0	R
T19	6297	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0
T23	6297	jeringa	0	0	R	RC	0	0	0
T7	Testigo	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0
T15	Testigo	jeringa	0	0	0	0	0	0	0

En el caso de las ramas podadas el síntoma más frecuentemente observado (hasta evaluación de 26.02.03) fue de resinación y solamente es obvia la presencia de canchros en 2 plantas de las 28 inoculadas con *F. circinatum* (Tabla 2.2.5-8). La resinación, en este caso, comenzó a observarse en la segunda semana de diciembre de 2002 (Figura 2.2.5-11).

Las respuestas inducidas por las cepas inoculadas son diferentes. La cepa 4641 produce síntomas en 50 % de las plantas inoculadas y la cepa 6297, solamente en 14% de las plantas inoculadas (Tabla 2.2.5-8). No hay síntomas en las plantas utilizadas como testigos.



Figura 2.2.5-11. Necrosis subcortical en ramas podadas de pino radiata inoculadas con *F. circinatum*.

Tabla 2.2.5-9. Resultados de inoculación con *F. circinatum* en la base del tallo de plantas de pino radiata de 6 años. Síntomas de resinación (R) y cancro (C) y dimensión de los cancos (mm).

Trat. N°	Tratamiento descripción		Síntomas y longitud del cancro en mm (7 repeticiones)							
	Cepa	método inoculación	1	2	3	4	5	6	7	Prom
T1	4641	sacabocado	RC	RC	RC	RC	RC	RC	RC	
			32	32	44	37	71	60	72	49,7
T9	4641	jeringa	RC	RC	R	R	0	RC	0	
			32	48	6	6	4	86	3	26,4
T17	6297	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0	
			9	9	9	9	9	9	9	9,0
T21	6297	jeringa	0	0	0	0	0	0	0	
			2	3	3	3	2	3	3	2,7
T5	Testigo	sacabocado	0	0	0	0	0	0	0	
			9	9	9	9	9	9	9	9,0
T13	Testigo	jeringa	0	0	0	0	0	0	0	
			3	3	3	2	3	2	2	2,6

El primer síntoma observado en las inoculaciones de la base del tallo fue de resinación (primera semana de enero de 2003), posteriormente (primera semana de febrero), fue posible observar en algunas plantas pequeñas rajaduras longitudinales pero no hubo síntomas obvios en la corteza de los cancos, que se presentan como cubiertos, definidos y embebidos en resina. Las plantas se extrajeron la segunda semana de febrero. Los cancos nunca circundaron el fuste por lo que no ocurrió síntomas de marchitamiento (Figura 2.2.5-12 y Figura 2.2.5-13).



Figura 2.2.5-12. Resinación del tallo de plantas inoculadas en la base con *F. circinatum*.



Figura 2.2.5-13. Cancros en el tallo de plantas inoculadas en la base con *F. circinatum*.

El comportamiento de las cepas en prueba fue, en este caso, (y hasta la extracción de plantas con síntomas), completamente opuesto: la cepa 4641 indujo respuesta en 86% de las plantas inoculadas mientras que la cepa 6297 en ninguna de las plantas (Tabla 2.2.5-9).

En este caso, también se observa que la inoculación con sacabocado es 100% efectiva, mientras que la inoculación con suspensión de esporas produce síntomas en 71% de los casos. Además, el largo promedio de los cancros es mayor (49,7 mm) para la inoculación con sacabocado que para el uso de suspensión de esporas aplicado con jeringa (26,4 mm) (Tabla 2.2.5-10).

Tabla 2.2.5-10. Comparación en porcentaje de respuestas de inoculación entre cepas #4641 y #6297 considerando el total de plantas inoculadas en cada caso.

Sitio de inoculación	Cepa 4641	Cepa 6297
Ápices	100%	14 %
Ramas	79 %	36 %
Ramas podadas	50 %	14 %
Tronco	79 %	0 %

Los resultados indican diferentes características en la patogenicidad de las cepas en prueba. La cepa 6297 es también patógena pero su agresividad es menor que la cepa 4641, el sistema de trabajo en este ensayo en terreno donde debe retirarse muy temprano el material afectado no permite obtener mayores resultados en cuanto a la severidad asociada a la actividad de cada aislamiento (Figuras 2.2.5-14, 2.2.5-15 y 2.2.5-16).



Figura 2.2.5-14. Ausencia de respuesta a cepa #6297 en inoculaciones en la base del tallo con suspensión de espора (T21) y con micelio (T17) de *F.circinatum*.



Figura 2.2.5-15. Respuesta variables de cepa #4641 en inoculaciones en la base del tallo con suspensión de espора de *F. circinatum*, ausencia de respuesta en 7-T9 resinación y cancro en 6-T9.



Figura 2.2.5-16. Comportamiento de testigos con inoculaciones en la base del tallo, con agua destilada (T13) y agar (T5).

Literatura consultada

- Arévalo V., O. 2002 Patogenicidad de *Fusarium circinatum* (Nirenberg y O'Donnell) en plantas de *Pinus radiata* D.Don de 18 meses mantenidas en contenedores. Memoria de Título. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Barnard E.L. and Blakeslee G.M. 1980. Pitch canker of slash pine seedlings: a new disease in forest tree nurseries. *Plant Disease* 64: 695-696.
- Blakeslee G.M., Kratka S.H., Schmidt R.A. and Moses C.S. 1978. Sporodochia of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) as found in diseased slash pines in Florida. *Plant Disease Reporter* 62: 656-657.
- Carey W.A. and Kelley W.D. 1994. Late-season mortality in longleaf pine nurseries caused by *Fusarium subglutinans*. *Phytopathology* 84:1096 (Abstract.).
- Gordon T.R., Storer A.J. and Wood D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128-1139.
- James R.L., Dumrose R.K., Gilligan C.J. and Wenny D.L. 1989. Pathogenicity of *Fusarium* isolates from Douglas-fir seed and container-grown seedlings. Idaho Forest, Wildlife and Range Experimental Station, College of Forestry, Wildlife and Range Sciences, University of Idaho. Station Bulletin 52.
- McCay-Buis T.S., Abney T.S., Cumming R.B. and Huber D.M. 1994. Pitch canker disease of white pine seedlings in Indiana. *Phytopathology* 84: 1122.
- Viljoen A., Wingfield M.J. and Marasas W.F.O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.
- Wingfield M.J., Wingfield B.D., Coutinho T.A., Viljoen A., Britz H. and Steenkamp E., 1999. Pitch canker: A South African perspective. In: Devey M.E., Matheson A.C. and Gordon T.R. (Eds). *Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine*. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey CA. 30 Nov.3 to 3 Dec. 1998.
- Wingfield M.J., Jacobs A., Coutinho T.A., Ahumada R. and Wingfield B.D. 2001. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *New Disease Report* 4.

4.18.NOMBRE DE LA META.

META 3

3. Establecer una metodología para la evaluación de resistencia a *F. circinatum*

4.18.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

3.1. Determinación de efecto de la edad en respuesta a la inoculación.

4.18.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La revisión de la literatura con respecto a la eventual existencia de resistencia de *P. radiata* contra infecciones de *F. circinatum* indica que habría dos opiniones. Los resultados de Hodges y otros (2002) muestran una extremadamente pobre tolerancia de las plantas de pino radiata en

pruebas de resistencia y consideran a la especie como altamente susceptible. Pero Gordon *et al.* (2001) indican la presencia de resistencia en individuos adultos y, más aún, indican la presencia de resistencia sistémica adquirida.

La ausencia de un sistema estandarizado de prueba de resistencia de material genético de *P.radiata* frente a inoculaciones con *F.circinatum* hace necesario considerar si hay variaciones en el tiempo del material en prueba. Camcore (2001) realizó las pruebas iniciales de cruzamientos de *P.radiata* con plantas de 12 semanas, para cambiar luego a plantas de 24 semanas (Hodges, 2001) Por otra parte, Storer *et al.* (1999) consideran que hay evidencia de resistencia en *P.radiata* con pruebas sobre ejemplares adultos.

La posibilidad que el comportamiento del material en prueba cambie con la edad es examinada en este estudio.

Material y Método

Las 5 familias sembradas, IF0003, MP0003, CR0025, MP0036 y PC0032, de semillas producidas por Forestal Mininco el año 2003, se separaron, cada una en 3 lotes de 3 tres bandejas cada uno, los que se inocularon en las fechas que se indican:

1. Junio 2005 a 25 semanas.
2. Enero 2006 a 54 semanas.
3. Septiembre 2006 a 90 semanas.

La inoculación se realizó decapitando las plantas y asperjando sobre cada bandeja 200 mL de una suspensión de conidias de *F.circinatum* de concentración $2,5 \times 10^3$ conidias/ml.

Los resultados se evaluaron por incidencia (numero de plantas sobre el total inoculado) y severidad (largo de la necrosis respecto a largo total del tallo).

Resultados y Discusión

Los resultados se entregan en las Tablas 3.1-1, 3.1-2 y 3.1-3.

Los resultados de incidencia indican que la familia MP003 presenta mayor incidencia en las tres evaluaciones. Sin embargo, el posible cambio en respuesta como cambio con la edad no se produce.

La severidad media no cambia substancialmente en las tres inoculaciones indicando que, en plantas juveniles, la edad de la planta no es un factor crítico, de ahí que la menor edad de prueba resultaría la más económica.

Tabla 3.1-1 Incidencia y severidad en Primera Inoculación.

Familia	Plantas afectadas (%)*	Severidad (%)*
MP0003	71,1 b	51,6 b
PC032	49,9 ab	31,5 a
CR0025	46,5 ab	48,6 b
IF0003	51,3 ab	42,8 ab
MP036	42,3 a	36,0 ab

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Tabla 3.1-2 Incidencia y severidad en Segunda Inoculación.

Familia	Plantas afectadas (%)*	Severidad (%)*
MP0003	56,9 b	58,5 b
PC032	13,5 a	21,9 a
CR0025	18,3 a	54,7 ab
IF0003	9,9 a	57,9 b
MP0036	27,6 a	27,8 ab

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Tabla 3.1-3 Incidencia y severidad en Tercera Inoculación.

Familia	Plantas afectadas (%)*	Severidad (%)*
MP0003	55,9 b	86,6 a
PC032	30,6 a	78,1 a
CR0025	45,1 ab	85,7 a
IF0003	33,3 a	81,0 a
MP036	23,3 a	90,9 a

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Literatura Consultada

- Camcore. 2001. Summary of pitch canker research organized by CAMCORE 1998- 2000. Mimeografiado. 11 pp.
- Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The Pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85: 1128-1139.
- Hodges, G.R. 2001. Modified protocols for screenings of *P.radiata* for resistance in pitch canker. Camcore-UDSA FS- CPF. Mimeografiado 13 pp.
- Storer, J.A., Bonello, P., Gordon, T.R., y Wood, D.L. 1999. Evidence of resistance to the pitch canker pathogen (*Fusarium circinatum*) in native stand of Monterey pine (*Pinus radiata*) Forestry Science 45: 500-505.

4.19.NOMBRE DE LA META.

META 3

3. Establecer una metodología para la evaluación de resistencia a *F. circinatum*

4.19.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

3.2. Prueba de métodos de inoculación.

4.19.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

No hay antecedentes de pruebas comparativas de métodos de inoculación de *F.circinatum* en plantas juveniles de *P.radiata*.

El objetivo del estudio es comparar métodos de inoculación al tallo y al follaje.

Material y Método

Se efectuaron tres estudios de comparación

- a). Aspersión con extracción de corteza en la base del tallo; 5 µL de suspensión concentración de $1 \cdot 10^5$ esporas/mL; plantas de estacas, 3 familias.
- b). Decapitación con aspersión y con depósito de gota; i). la inoculación por depósito en el ápice de 20 µL de la suspensión y por aspersión, sobre 22 plantas igualmente decapitadas, y utilizando el mismo inóculo (mezcla de cepas 4641 y 6522) en la misma concentración.
- c). Decapitación con aspersión y con depósito de gota; ii). se inoculó con suspensión de esporas ($1 \cdot 10^3$ esporas/mL) correspondientes a mezcla de cepas 4641 y 6522. Plantas de 4 meses se decapitaron, y posteriormente, se aplicaron los tratamientos correspondientes a inoculación con microgota (20 µL /planta) y aspersión. Después de tres meses se midió la longitud de la necrosis y la altura de las plantas.

A los datos se les aplicó análisis de varianza y para la comparación de medias se empleó el test de Tukey.

Resultados y Discusión

Estudio a).

Según lo observado, las inoculaciones en la base del tallo no parecen ser un método adecuado de prueba en plantas con diámetros bajo 5 mm como las probadas, excepto que se evalúe por mortalidad, lo que requiere, a su vez, alto número de plantas en prueba.

Básicamente lo que ocurre es que el cancro que se forma en la zona de inoculación circunda rápidamente el tallo causando la muerte de los tejidos sobre el cancro, no siendo posible evaluar el tamaño de los cancos.

Tampoco parece necesario extraer bocados de corteza para inocular, ya que basta una leve incisión en bisel hecha con bisturí para exponer los tejidos a inocular.

Estudio b).

Cuando el porcentaje promedio de infección para inoculación por aspersión de la suspensión de esporas mostró incidencia de 26,4%, la infección alcanza a 90,9% de las plantas cuando se inocula por depositación de gota sobre ápice. Esto significa que la respuesta implica a mayor número de la población inoculada.

Estudio c).

Al término del ensayo se encontró que, en promedio, las plantas tratadas con aspersión provocaron lesiones de mayor tamaño que a las que se les aplicó la microgota.

Tabla 3.2-1 Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Tamaño necrosis (%)
Bandeja	
Microgota	20,6 a
Aspersión	48,3 b

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

La microgota aplicada sobre el corte provoca muerte del tallo en menor longitud que la muerte producida por aspersión de suspensión de esporas, probablemente porque la gota se aplica en un solo punto. La aspersión significa múltiples puntos de infección.

Los resultados indican que las inoculaciones con microgota en el corte aseguran un mayor número de respuestas pero de menor severidad.

4.20.NOMBRE DE LA META.

META 3

3. Establecer una metodología para la evaluación de resistencia a *F. circinatum*

4.20.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

3.3. Prueba de estabilidad de material.

4.20.2.AVANCE A LA FECHA

Este estudio suponía su realización sobre material clonal y bajo condiciones sobre manejo del patógeno que variaron después de la presentación del proyecto.

Éste estudio, pretendía obtener antecedentes sobre la variabilidad de las muestras en ensayo de inoculación para la determinación de familias o clones tolerantes o resistentes a la enfermedad.

El estudio planteó su instalación después de la obtención de los resultados de los Ensayos 3.1 y 3.2 y de la suma de los conocimientos adquiridos en el transcurso del proyecto. Analizando los resultados a la fecha (semestre 6) se determinó que para la instalación de este ensayo sobre

estabilidad del material se requería mantener altas poblaciones de *P. radiata* relativamente homogéneo genéticamente, lo que hace imposible realizarlo con la legislación actual, ya que no se cuenta con el espacio disponible en el invernadero cuarentenario para realizar el estudio, aunque éste estuviese vacío.

La realización de este estudio se consideró, por lo tanto, impracticable.

Por otra parte, el estudio asumía que un mínimo de 3 poblaciones de clones inoculados con *F.circinatum* quedarían disponibles para la observación de su respuesta al patógeno.

Cada población clonal debía ser superior a 625 plantas (25 planta por 25 repeticiones según lo propuesto en el proyecto). Esta cantidad de plantas de un mismo clon no esta disponible actualmente en las empresas donde la prioridad del material clonal producido está en satisfacer sus propios estudios de mejoramiento de producción.

El estudio se reemplazó por una prueba de concentración de inóculo informado en el estudio 2.1.2.a.

4.21.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.1. Patogénesis de *F. circinatum*

4.21.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.1.1. Efecto de la temperatura en la ocurrencia de la enfermedad

4.21.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El comportamiento de las enfermedad en el transcurso del año, como las que se asocian a *Fusarium circinatum*, es importante para considerar aspectos de manejo o evaluación de los ataques. Se considera que la temperatura es uno de los factores de medio que mejor explica la intensidad de las enfermedades en las poblaciones y sus manifestaciones en algunas épocas del año. Así y aun cuando algunas enfermedades se manifiesten en otoño, como la muerte apical causada por *Sphaeropsis sapinea*, es el efecto de la temperatura y el escaso suministro de agua en verano el ocasiona el estrés que predispone a las plantas al ataque o avance del patógeno.

El hongo *F. circinatum*, patógeno de pinos ocurre en Chile solamente en viveros y huertos de plantas madres usados para obtener estacas requeridas para propagación vegetativa. Ocasionalmente, el patógenos se ha encontrado causando muerte de plantas recientemente plantadas provenientes de viveros infestados. La enfermedad en los viveros es usualmente detectada en verano y otoño, dado el ritmo de crecimiento de los viveros, todos de siembra de primavera, pero, cuando aparece en plantaciones recién establecidas, puede observarse durante todo el año plantas aisladas con síntomas.

El efecto de la temperatura en la ocurrencia de la enfermedad no ha sido completamente estudiado. McDonald *et al.* (1994) estudiaron el efecto de la temperatura en el desarrollo de canchros demostrando mayor crecimiento de las lesiones a mayor temperatura durante el período

de incubación, bajo condiciones controladas. Por el contrario, Kuhlman *et al.* (1982), en un estudio de terreno, indican que la mayor incidencia de la enfermedad ocurre en invierno, independientemente de cuando haya ocurrido las inoculaciones. En otro trabajo, Correll *et al.* (1991) inoculando árboles en distintas oportunidades en el año, no indica un efecto de las épocas sobre la enfermedad.

Con el objetivo de conocer cual sea el efecto de la época de inoculación e indirectamente de la temperatura, se realizó un estudio con inoculaciones bimensuales durante dos años.

Material y método.

El estudio se llevó a cabo al exterior, bajo malla, en el vivero Carlos Douglas, sobre plantas que, al inicio del estudio, tenían 19 meses y que previamente habían sido transplantadas a maceteros de 3 L de capacidad.

Las inoculaciones se efectuaron en la zona sub-ápical haciendo una pequeña incisión en bisel en la corteza con bisturí esterilizado y depositando 20 μL de una suspensión de esporas de concentración 1×10^5 , preparadas según Anderson (1986) con una mezcla de cepas 4641 y 6522, probadas como virulentas en otros estudios, y las cepas menos virulentas 6297 y Álamo.

El efecto de las inoculaciones fue observado semanalmente, procediendo a podar los segmentos superiores de cada planta en cuanto mostrasen síntomas como marchitez, clorosis o necrosis de acículas. La poda siempre se hizo en el tejido verde inmediatamente bajo los tejidos con síntomas. Al final del estudio, abril de 2007, las respuestas a la inoculación fueron evaluadas con una escala donde:

- 0= ausencia de lesión.
- 1= resinación y cancro.
- 2= avance del cancro hacia la base y una poda.
- 3= avance del cancro y dos podas de rebaje.
- 4= avance del cancro y tres podas.
- 5= muerte de la planta.

Las inoculaciones, sobre 10 plantas en cada oportunidad, se iniciaron en mayo y luego continuaron en julio, septiembre, noviembre de 2004, enero, marzo, mayo, julio, septiembre y noviembre de 2005, enero, marzo y mayo de 2007. En noviembre 2004, enero 2005 y enero 2006 se inoculó plantas testigo solamente con agua destilada.

Resultados

La incidencia total ocurrida en el estudio alcanzó a 72% de las plantas inoculadas, fluctuando entre 50%, (enero 2005) y 100% (septiembre 2005), ocurriendo enfermedad en todos los meses cubiertos en el período de estudio (Tabla 4.1.1-1).

Tabla 4.1.1-1. Severidad estimada según escala de evaluación: inoculaciones con *F.circinatum* en los meses que se indican.

Tratamiento mes de inoculación	Tiempo transcurrido (meses)	Plantas										Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
May/06	12	2	2	2	0	1	2	0	1	0	0	10
Mar/06	14	1	0	2	2	0	2	2	2	2	1	12
Ene/06	16	2	2	2	0	0	2	2	2	2	2	16
Nov/05	18	2	3	0	5	2	0	5	3	0	5	25
Sep/05	20	3	3	1	3	4	2	3	4	4	3	30
Jul/05	22	3	3	5	3	4	4	0	4	0	3	26
May/05	24	0	0	3	2	2	0	2	2	0	2	13
Mar/05	26	3	0	0	2	3	2	2	3	4	2	21
Ene/05	28	0	2	3	0	2	5	5	0	0	0	17
Nov1/04	30	5	0	3	5	2	5	0	0	2	0	22
Sep/04	32	2	2	5	0	5	0	0	5	5	0	24
Jul/04	34	5	0	0	5	2	0	5	2	5	5	29
May/04	36	5	5	2	5	2	5	0	0	5	5	34
T/nov/04	30	0	0	0	0	0						0
T/ene/05	28	0	0	0	0	0						0
T/ene/06	16	0	0	0	0	0						0

La enfermedad ocurre de dos modos: solamente como resinación y cancro delimitado que se extienden en torno al punto de inoculación, (código evaluación 1) situación que ocurre en el 5,6% de los casos con respuesta y que podría relacionarse con los grados de lignificación de los tejidos inoculados. Más frecuente es la ocurrencia de la enfermedad como un cancro difuso (94,6% de los casos) que circunda rápidamente el tallo superior, ocasionando marchitamiento y muerte del ápice o tallo distal al punto de inoculación y que posteriormente se va extendiendo desde el punto de inoculación hacia la base del tallo pudiendo ocasionar la muerte de la planta. El descenso observado no es un proceso rápido y, en algunos casos, los nuevos síntomas producidos después de podar los ápices necrosados o marchitos tardan más de 8 semanas en presentarse en la zona superior del tallo podado.

Este proceso de avance de la enfermedad no dependería de la época de inoculación si no más bien sería una respuesta individual de las planta y del tiempo transcurrido desde la inoculación. No es posible establecer un efecto de la época sobre la intensidad de la enfermedad, en la temporada 2004, las inoculaciones de mayo y julio tienen valores totales para cada época de inoculación de 34 y 29, pero en la temporada 2005 solo alcanzan valores de 13 y 26, respectivamente. Por otra parte, en cada época de inoculación (excepto septiembre 2005) hay plantas que no muestran síntomas de infección, por ejemplo, en mayo 2004 de 6 plantas que mueren hay 2 que no sufren enfermedad y en enero 2005, mueren 2 plantas pero hay 5 que no manifiestan síntomas.

Por tratarse de síntomas, como el cancro difuso, que avanza lentamente, se observa que las tres últimas épocas de inoculación, la suma de los valores de evaluación no llega a ser 50% de los valores alcanzados en las tres primeras inoculaciones del estudio.

El período de incubación es altamente variable en el estudio, pero tiende a ser mayor en inoculaciones de otoño e invierno que inoculaciones de primavera y verano (Tabla 4.1.1-2).

Tabla 4.1.1-2. Períodos de incubación y latencia en ensayo de épocas de inoculación (en semanas).

Tratamiento inoculación	Período de incubación		Período de latencia
	(marchitez)	(necrosis acícula)	
Mayo 2004	9	14	53
Julio 2004	8	11	54
Septiembre 2004	4	6	104
Noviembre 2004	4	5	no se observó
Enero 2005	4	5	36
Marzo 2005	4	5	no se observó
Mayo 2005	11	16	no se observó
Julio 2005	9	11	no se observó
Septiembre 2005	7	9	54
Noviembre 2005	6	7	no se observó
Enero 2006	4	6	30
Marzo 2006	5	7	no se observó
Mayo 2006	10	12	no se observó

La formación de esporoquios se trató de evitar con la poda, pero igualmente se produjo en algunas escasas plantas: no más de 3 (mayo 2004) y usualmente una para cada época cuando ocurren (Tabla 4.1.1-2). Los datos obtenidos indican que los esporoquios se forman en tejidos suculentos necrosados, ápices (mayo 2004, enero 2006), y en el cuello de las plantas cuando la infección ha alcanzado todo el tallo.

Los resultados obtenidos indican que la enfermedad puede establecerse en todas las épocas del año, lo que hace impracticable el eventual uso de control químico de la enfermedad. El síntoma más frecuente es un cancro difuso que baja desde el ápice a tejidos más lignificados, cuya severidad es variable entre plantas sin que ésta parezca depender de la oportunidad de la inoculación.

Literatura consultada

- Anderson, R.L. 1986. New method for assessing contamination of slash and loblolly pine seed by *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S., Wood, L.D, y Schlutz, M.E. 1991. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). Plant Disease 75: 676-682.
- Kuhlman, E.G., Dianis, S.D. y Smith, T.K. 1982. Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard in North Caroline. Phytopathology 72: 1212-1216.

McDonald, M.J., Gordon, T.R. y Bro, W.E. 1994. Temperature effects on pitch canker caused by *Fusarium subglutinans* on Monterey pine (*Pinus radiata*). Phytoathology 84: 1095 (Abstract).

4.22.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.1. Patogénesis de *F. circinatum*

4.22.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.1.2. Efecto del contenido de humedad de suelo en la ocurrencia de la enfermedad.

4.1.2.a. La humedad como factor de predisposición a la enfermedad.

4.1.2.b. Efecto de la humedad del suelo sobre el desarrollo de la enfermedad.

4.22.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La incidencia de numerosas enfermedades de los árboles, sean de raíces o de ramas y follaje, depende de los contenidos de humedad del suelo, en algunos casos porque las condiciones de humedad favorecen al patógeno, como es condiciones de alta humedad de suelo y ocurrencia de enfermedades asociadas a *Phytophthora cinnamomi* y otros Oomycetes, y en otros casos porque el estrés hídrico del huésped es un factor predisponente al avance del patógeno, como ocurre en el patosistema *Pinus-Sphaeropsis sapinea* (Bachi y Peterson ,1983) o, simplemente es un factor que dificulta la normal respuesta defensiva de la planta, como es el caso de plantas afectadas por *Macrophomina phaseolina*.

No existe información conclusiva sobre el efecto de la humedad de suelo en la ocurrencia del cancro resinoso. Dwinell *et al.* (1985) citan a Barnett y Thor (1978) quienes indicarían que la susceptibilidad de *P.virginiana* a cancro resinoso aumenta en sitios pobremente drenados. La sequía se ha asociado a la epifitía 1974-75 en Florida pero no se relaciona con ataques en huerto semilleros en Mississippi y Carolina del Norte (Dwinell *et al.*1985). Blakeslee *et al.* (1992) en un experimento, somete plantas de *P. elliotti* var *elliottii*, con diferente grado de susceptibilidad a *F.circinatum*, a estrés hídrico periódico seis meses después de la inoculación y concluye que el desarrollo del cancro resinoso en esa especie responde a un estrés hídrico en el huésped.

La tremenda diferencia de climas y la no menor diferencia en capacidad de retención de agua de los suelos donde se planta pino en el país hacen interesante conocer el efecto que el estrés hídrico tendría sobre el desarrollo de la enfermedad como ocurren en Chile.

Material y método.

El estudio se realizó en el vivero Carlos Douglas (Forestal Mininco) sobre plantas de más de 3 años, mantenidas en contenedores de plástico de 20 L de capacidad, llenado con suelo de textura arenosa. Las plantas en las macetas fueron regadas diariamente con manguera y “chaya”. Las plantas fueron inoculadas (diciembre 2006) en el cuello mediante una incisión en bisel y depositación de 20 µL de una suspensión de esporas de *F.circinatum* (mezcla cepas 4641 y 6522) de concentración $1 \cdot 10^5$ y evaluadas 120 días después por tamaño del cancro.

El estudio se dividió en dos partes. El efecto del estrés hídrico antes de la inoculación (predisposición) se midió sometiendo plantas a períodos de 0, 3, 6, 9 y 12 días sin riego y para estudiar el efecto del estrés hídrico sobre el curso de la enfermedad, se sometió plantas a períodos sin riego iguales a los señalados, pero inmediatamente posteriores a la inoculación.

El período sin riego en cada tratamiento se logró cubriendo el área expuesta de cada macetero con una bolsa de plástico negro que se ajustaba desde el cuello de las plantas.

La unidad experimental fue la planta y el número de plantas por tratamiento fue 10.

Para cada tratamiento de riego hubo 10 plantas sometidas a heridas en la base del tallo pero no inoculadas.

Para cada tratamiento de riego hubo 10 plantas sometidas a heridas en la base del tallo pero inoculadas sólo con agua destilada estéril (ADE) y cubiertas igualmente con bolsa de plástico.

Los datos fueron sometidos a análisis de covarianza, considerando como covariable el diámetro de cuellos de las plantas, para la comparación de medias se emplea la prueba de tukey ($\alpha=0,05$).

Tabla 4.1.2-1. Tratamientos empleados en estudio de predisposición.

Tratamientos	Subtratamientos	Días sin riego
I12	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	12
T12	Inoculado con ADE	12
I9	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	9
T9	Inoculado con ADE	9
I6	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	6
T6	Inoculado con ADE	6
I3	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	3
T3	Inoculado con ADE	3
I0	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	0
T0	Inoculado con ADE	0

Tabla 4.1.2-2. Tratamientos en estudio del efecto de estrés hídrico post-inoculación.

Tratamientos	Subtratamientos	Días sin riego
I0	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	0
T0	Inoculado con ADE	0
I+3	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	3
T+3	Inoculado con ADE	3
I+6	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	6
T+6	Inoculado con ADE	6
I+9	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	9
T+9	Inoculado con ADE	9
I+12	Inoculado con <i>F. circinatum</i>	12
T+12	Inoculado con ADE	12

Resultados y discusión.

Después de 120 días desde la inoculación de las plantas se encontró que sólo 4 de ellas habían muerto, tres por *F. circinatum* (tratamientos I+12 y I+3) y una por *Diplodia pinea* (tratamiento I+12).

Al analizar la longitud de los canchros no se encontró evidencia que permita establecer un efecto del estrés hídrico pre y post inoculación en la severidad de la enfermedad (Figura 4.1.2-1). Cuando se usa el anillamiento de la lesión en el tallo como parámetro de evaluación, tampoco se observó efecto de los tratamientos, sin embargo, se encontró que en los tratamientos con estrés post inoculación, los canchros anillaron completamente las plantas (Figura 4.1.2-2).

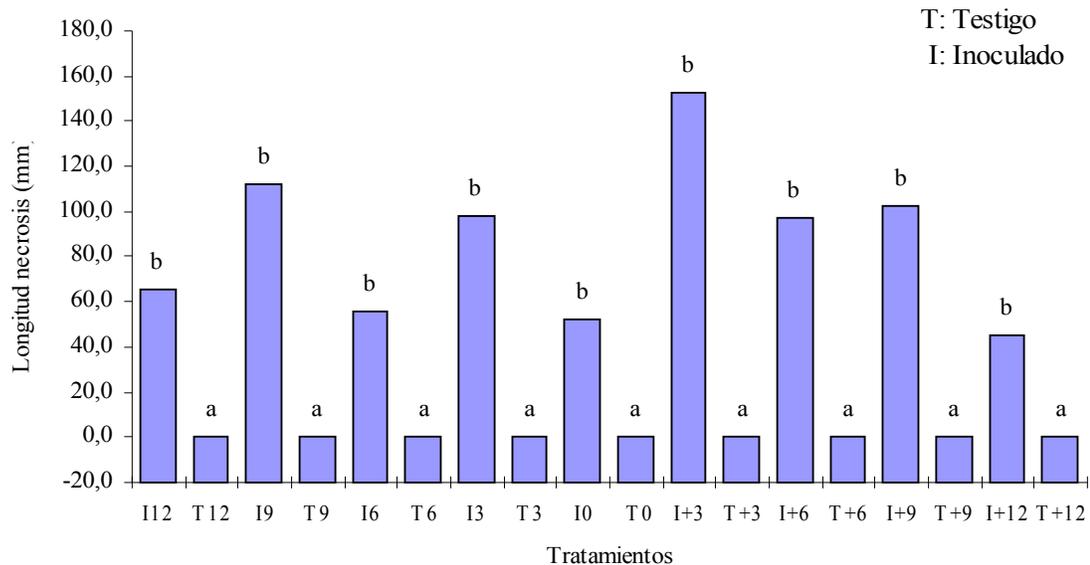


Figura 4.1.2-1. Longitud de los canchros en los distintos tratamientos.

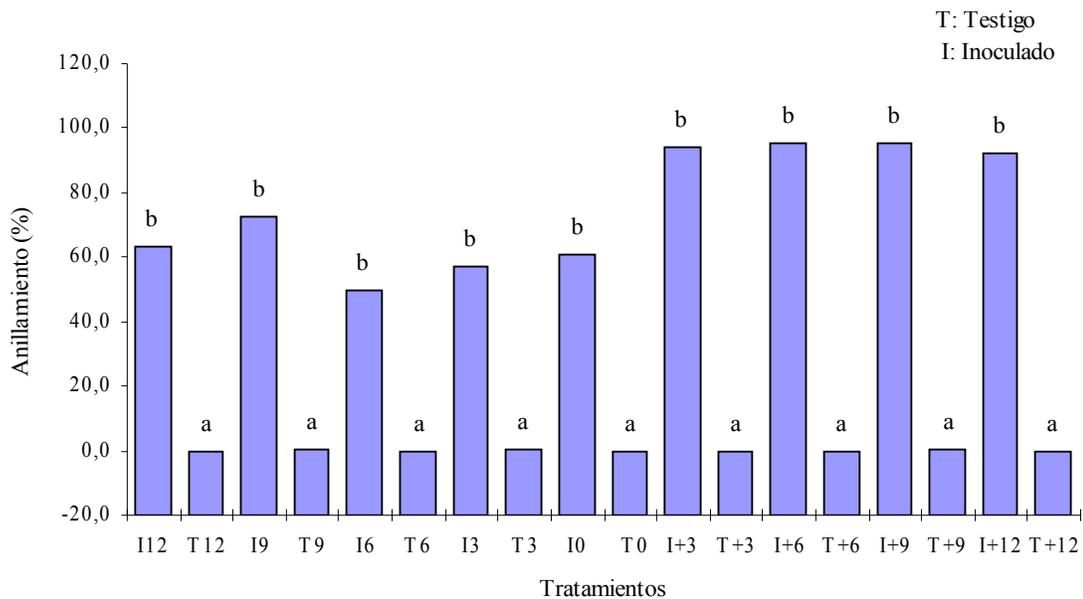


Figura 4.1.2-2. Anillamiento en la zona de inoculación.

Los resultados obtenidos indican independencia de la severidad de la enfermedad expresada como canchros de estrés hídrico como factor de predisposición.

Literatura consultada

- Bacchi, R.P. y Peterson, J.T. 1983. The effect of soil water potential on *Diplodia pinea* growth in three *Pinus* species. *Phytopathology* 73: 362.
- Blakeslee, G.M., Lante, W.E. y Allen, J.E. 1992. Influence of periodic water stress on pitch canker disease in resistant an susceptible slash pines families. *Phytopathology* 82: 1096.
- Dwinell, L.D., Barrows-Broadus, J.B. y Kuhlman, E.G. 1985. Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* 69: 270-276.

4.23.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.2. Saprogénesis de *F. circinatum*

4.23.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.2.1. Duración del inóculo de *F. circinatum* en el suelo.

4.2.1.a. Duración del inóculo de *F. circinatum* en suelo natural.

4.2.1.b. Duración del inóculo de *F. circinatum* en suelo con materia orgánica reducida.

4.23.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

El hongo *Fusarium circinatum* causa la enfermedad conocida como cancro resinoso que típicamente afecta órganos aéreos de diversas especies de pino. Además, *F.circinatum* es capaz de causar enfermedades en la base del tallo y raíces desde inóculo que sobrevive en el suelo. (Barnard y Blakeslee, 1980; Carey y Kelley, 1994). A diferencia de otras especies que poseen clamidosporas que es una estructura de resistencia que les permite sobrevivir sobre restos vegetales o en el suelo, *F.circinatum* no posee tales estructuras de resistencia sino solamente macro y microconidias, sin embargo ha sido establecido que dura más de un año en el suelo seco (Gordon *et al.* 2001) Es posible que el hongo posea capacidad saprofítica y sobreviva de este modo sobre restos vegetales en descomposición. Estudios de Bolkan *et al.* (1979) en Brasil, con *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* indican que las esporas del hongo no sobreviven más de 13 semanas en ausencia de tejidos del huésped, pero el hongo puede colonizar segmentos esterilizados de tejido de maíz, porotos y soya sobre los cuales sobrevive por un año, lo que explicarían su supervivencia.

Tener antecedentes sobre la supervivencia de *F.circinatum* en condiciones naturales es importante para considerar las medidas de manejo que pudieran aplicarse en viveros. En este estudio se mantendrá suelo natural y arena cuarzosa, libre de materia orgánica, inoculados y enterrados en el suelo por diferentes tiempos para medir su supervivencia como inóculo.

Material y método.

El suelo, de textura arenosa, del vivero Carlos Douglas fue esterilizado en autoclave en dos días consecutivos, luego inoculado con una mezcla de cepas de *F.circinatum*. El inóculo fue preparado sobre granos de avena (Viljoen *et al.* 1994), que luego fueron secados y finamente molidos para al final ser mezclados homogéneamente con el suelo: 200 gr de avena para 30 kg de suelo, en una gamella de mayor capacidad.

El estudio con suelo sin materia orgánica se realizó usando una mezcla de arena cuarzosa y de arena usada en jardinería para mejorar infiltración de suelo (LAMPA TM) y el inóculo se preparó como un lavado de 200 gr de avena inoculada para 30 kg de mezcla de arena.

Una alícuota (250 gr) de cada tipo de suelo se colocó en cada una de 94 bolsas preparadas con medias de nylon, las que se depositaron, espaciadas a 30 cm, en el fondo de un surco de 25 cm de profundidad abierto en un sector no cultivado del vivero Carlos Douglas, él que luego fue cerrado y mantenido sin disturbar.

Cuatro muestras de cada tipo de suelo se retiraron mensualmente durante 22 meses, esto es hasta dos meses antes de lo planificado, debido a que el área donde se mantenían las bolsas enterradas sería utilizada por el vivero. Durante los dos últimos meses las bolsas restantes se mantuvieron a la obscuridad dentro de sacos, en laboratorio.

La supervivencia del inóculo agregado se midió por placa dilución (Johnson y Curl, 1972), 25 gr de suelo en 250 mL de agua destilada esterilizada, diluida luego a 1:100 y 1 mL de la dilución depositado sobre medio selectivo. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia, "cfu" o "ufc".

Resultados

Las poblaciones iniciales decrecen ligeramente los primeros dos meses en el suelo natural pero en el tercer mes ya las cfu representan 50% de la población inicial y en el cuarto a quinto mes solamente el 10% de las cfu inicial. Luego las poblaciones se mantienen a niveles bajo el 5% del nivel inicial durante 7 meses (Tabla 4.2.1-1).

Tabla 4.2.1-1. Sobrevivencia de *F.circinatum* en suelo y arena medidos como ufc.

Tiempo (mes)	UFC/gr	
	Suelo	Arena
Inicio	9.573,3	231,1
Dic-04	7.865,0	85,0
Ene-05	7.950,0	65,0
Feb-05	4.645,0	8,0
Mar-05	1.021,9	7,2
Abr-05	960,0	7,2
May-05	248,9	3,1
Jun-05	160,7	1,9
Jul-05	417,5	2,5
Ago-05	427,0	2,0
Sep-05	340,0	2,5
Oct-05	357,5	5,0
Nov-05	307,5	17,5
Dic-05	1.260,0	220,0
Ene-06	1.057,5	15,0
Feb-06	990,0	12,5
Mar-06	802,5	10,0
Abr-06	705,0	7,5
May-06	660,0	7,5
Jun-06	592,5	5,0
Jul-06	525,0	5,0
Ago-06	487,5	5,0
Sep-06	410,0	2,5
Oct-06	375,0	0
Nov-06	250,0	0
Dic-06	68,0	0

A un año de instalado las bolsas se observó un ascenso sobre 10% en las poblaciones expresadas como ufc, efecto que se mantiene por tres meses para iniciar un nuevo y constante descenso para llegar a los 24 meses a menos de 1 % de la población original.

El comportamiento de supervivencia de las poblaciones en arena libre de materia orgánica es similar a la descrita para el suelo normal de vivero, sin embargo el descenso inicial es más marcado y el ascenso a los doce meses de instalado el estudio es muy superior, tanto que las poblaciones ascienden bruscamente desde 7,6% en noviembre a 95% en diciembre, pero vuelven a caer en el mes siguiente a niveles más bajos que los de noviembre. La duración de *F.circinatum* en arena contradice el trabajo de Bolkan *et al.* (1979) en cuanto el inóculo aplicado, suspensión de esporas, pudo sobrevivir por más de 20 meses.

No se tiene explicación para el ascenso de las poblaciones a los 12 meses de iniciado el estudio. En un área vecina, unos 5 a 6 m a lo largo de el surco con las bolsas enterradas se mantuvo, por meses, pilas de restos de plantas madres (tallos y raíces) que fueron luego quemadas. Posteriormente, el área comenzó a ser laboreada y trabajada para trazado e instalación de cañerías de un sistema de riego. Sin embargo, no se sabe si estas faenas pudieron haber influido en el alza observada de las ufc y su subsecuente rápido descenso.

Literatura consultada

- Bolkan, H.A., Dianese, J.C. y Cupertino, F.P. 1979. Survival and colonization potential of *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* in soil. *Phytopathology* 69: 1298-1231.
- Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128-1139.
- Johnson, L.F. y Curl, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soilborne plant pathogens. Burgess Pub.Co., N.Y. 247 pp.
- Viljoen, A. Wingfield, M.J. y Marassas, W.F.O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.

4.24.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.2. Saprogénesis de *F. circinatum*

4.24.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.2.2. Rol del sustrato de corteza en la sobrevivencia de *F. circinatum*.

4.2.2.a. Sobrevivencia de *F. circinatum* sobre sustrato artificialmente inoculado.

4.2.2.b Colonización de partículas de sustrato artificialmente inoculado con *F. circinatum*.

4.2.2.c. Capacidad de *F. circinatum* para colonizar sustrato de corteza de pino.

4.24.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Muchos hongos asociados a enfermedades de raíces de pino han sido aislados desde el sustrato de corteza usado como medio de crecimiento en producción de plantas. Huang y Kuhlman (1990) aislaron desde corteza, entre otros hongos, *Fusarium moniliforme* var *moniliforme*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* pero no aíslan *F. moniliforme* var *subglutinans* (= *F. circinatum*) del sustrato sino desde semilla. Viljoen *et al.* (1994) señalan que *F. circinatum* coloniza abundantemente el sustrato desde plantines infectados y muertos. Wingfield (1999) afirma que el hongo se encuentra en el medio de crecimiento. Observaciones realizadas en estudios del proyecto, utilizando el método de placa dilución aplicado a corteza, (Johnson y Curl, 1972) indican que *F. circinatum* se encuentra asociado a el sustrato de pino tomado desde tubos o bandejas almacigueras donde habían muerto plantines de pino radiata. Ningún trabajo ha evaluado de qué modo *F. circinatum* se asocia al sustrato. Se puede establecer, teóricamente al menos, que este patógeno no tendría capacidad para degradar celulosa o lignina, principales componentes del

substrato de modo que su capacidad de permanencia en este medio debería estar dada por otros componentes del sistema de producción de plantas como nutrientes aportados por la fertilización o aún por otros productos entregados al medio por organismos que han participado en el proceso de compostación de la corteza. De este modo habría dos posibilidades para el hongo: sobrevivir, en algún estado de letargo, sobre el substrato o aumentar su masa o número de propágulos (colonizar) a partir de algún alimento disponible más probablemente dentro de las partículas de corteza. La evidencia indirecta entregada por Huang y Kuhlman (1990) que aíslan los hongos desde partículas de substrato esterilizado superficialmente, indicaría que algunos hongos patógenos pueden crecer dentro de la corteza.

En este informe se entrega resultados de estudios realizados para examinar la supervivencia de *F.circinatum* en corteza y su capacidad de colonizar este substrato.

Material y Método.

a) Muestreo de presencia en corteza: la presencia de *F.circinatum* se evaluó en substrato de corteza mantenido en pilas, cercano a mesas en producción, en un vivero (El Álamo) positivo a la presencia del patógeno. Igualmente se tomó muestras de substrato obtenido desde celdas de plantas con síntomas atribuibles a *F.circinatum*.

b) Supervivencia de *F.circinatum* en substrato.

Substrato compostado fue humedecido y colocado en bolsas para esterilización en autoclave (1 hora 121°C, 100 kPa). El substrato esterilizado frío fue depositado en vaso de vidrio de 600 mL de capacidad, añadiendo luego una suspensión de esporas (Anderson 1986) de *F.circinatum* de concentración 1×10^5 , hasta rellenar el vaso cubierto con una fina malla de plástico para contener las partículas. Las partículas se mantuvieron en inmersión en la suspensión de esporas durante 5 minutos, luego la suspensión fue vaciada y las partículas dejadas secar al aire en cámara de flujo. El substrato inoculado fue colocado en bolsas e incubado a 24°C y se procedió a tomar muestras cada 30 días durante 3 meses. Para evaluar la presencia de *F.circinatum* en las partículas se sembró 10 partículas en 10 placas Petri con medio NSM como unidad experimental con 5 repeticiones.

Una segunda inoculación se realizó inoculando el substrato con una suspensión de esporas (1×10^5) de las cepas 6297, 6522 y 4641. El substrato inoculado se colocó en frascos de vidrio de 300 ml y se incubó a 22°C para evaluación hasta 5 meses.

Como método alternativo de determinación de *F.circinatum* en las partículas se estudió otra metodología de análisis del substrato. Para ello se probó substrato tamizado (1-5 mm) esterilizado e inoculado. Alícuotas de 0,1 gr, 1 gr, 2 gr, 5 gr y 10 gr fueron suspendidas en ADE y agitadas por 20 minutos y una dilución fue sembrada en medio selectivo NSM acidificado. Este procedimiento fue aplicado a substrato inoculado para el estudio 2.2.3.b (inoculación del substrato) y mantenido hasta 12 meses en bolsas de malla nylon, a ambiente de laboratorio.

En seis muestras de substrato (T2, T6, 15, 16, 25 y 32) se separó las partículas en 2 tamaños, mayores y menores de 5 mm y una muestra de partículas se sembró directamente en medio selectivo, 10 placas con 10 partículas por placa.

c) Colonización de partículas.

Una alícuota de sustrato inoculado fue sometida a dos procedimientos de esterilización superficial: i). solución 1% de hipoclorito de sodio durante 5 minutos y ii). peróxido de hidrógeno 30 vol. durante 15 minutos, luego las partículas se secaron al aire y se procedió a sembrarlas en medio NSM.

Para ambos estudios se colocó 10 partículas por placa, la unidad muestral fue 10 placas y el número de repeticiones 5.

d) Crecimiento de *F.circinatum* sobre sustrato.

Un segundo estudio sobre la capacidad de colonización del sustrato consistió en la utilización de dos tubos de pvc 2,5 cm de diámetro y 15 cm de longitud insertos en ambos laterales de una unión en T de pvc. Sustrato inoculado con una suspensión de esporas ($1 \cdot 10^4$ esporas/mL) de *F.circinatum* fue introducido por la parte superior de la T central y, por los tubos laterales, se introdujo sustrato esterilizado en autoclave (121°C por 20 minutos). Los extremos fueron luego cerrados con gasa estéril, que permitían la aireación del sistema los tubos fueron mantenidos a 24°C. Después de tres meses se tomó muestras de aproximadamente 12,5 g de sustrato cada una que fueron agitadas en 250 mL de agua destilada estéril por 20 minutos, posteriormente se tomó un mL de la suspensión que fue diluido 100 veces. Desde la dilución final se tomaron 10 muestras de 0,5 mL que fueron sembradas, cada una de ellas en medio selectivo para *Fusarium*.

El estudio se realizó sobre 4 tubos y se evaluaron tres puntos en cada uno: el lugar de inoculación (parte central) y los dos extremos del tubo.

Resultados

a) Presencia de *F.circinatum* en sustrato.

Tabla 4.2.2-1. Determinación de *F.circinatum* sobre corteza compostada en vivero El Álamo.

Muestra	Organismos	UFC
Pila caliente	Otros	2
Pila madura	Otros	116
Platabanda 30 (a)	Otros	129
Platabanda 30 (b)	Otros	2
Mesón 28/29 (a)	<i>Fusarium</i> sp.	208
Mesón 28/29 (b)	Otros	14
Mesón 28/29 (c)	Otros	129
Mesón 83	<i>Fusarium</i> sp.	168

No se obtiene especies de *Fusarium* desde muestras tomadas de las pilas de corteza, estas solamente aparecen en mesones donde hay crecimiento de plantas de pino pero no corresponden a *F.circinatum*.

Las lecturas de colonización de las partículas por siembra directa de éstas, en medio selectivo, han entregado resultados que demuestran pobre efectividad del procedimiento de trabajo. Es probable

que el número de 10 partículas que se siembra sea muy bajo para aplicarlo como procedimiento seguro de determinación de la población del hongo sobre el sustrato. A pesar de ello este resultado indica que la siembra directa de partículas puede aplicarse.

b) Supervivencia de *F.circinatum* en sustrato.

Los muestreos a 30, 60 y 90 días indican 100% de colonización de las partículas, artificialmente inoculadas indicando que el patógeno sobrevive adecuadamente por 90 días, a lo menos, sobre el sustrato.

Similar método aplicado al sustrato inoculado y mantenido en envases de vidrio a 22° C conservó viable el inóculo agregado por 5 meses.

El procedimiento alternativo de prueba de presencia de *F.circinatum* en sustrato aplicando el método placa dilución (Johnson y Curl,1972) fue aplicado sobre sustrato artificialmente inoculado y utilizado en otros estudio (2.2.3.b) después de estar almacenado en condiciones del ambiente de una bodega de productos durante un año.

Tabla 4.2.2-2. Presencia de *Fusarium circinatum* a 12 meses de inoculación sobre sustrato artificialmente inoculado.

Muestra	Presencia <i>F.circinatum</i>	Muestra	Presencia <i>F.circinatum</i>	Muestra	Presencia <i>F.circinaum</i>
T1	+	11	+	22	+
T2	+	T12	+	23	-
T3	+	T13	+	24	+
T4	+	14	-	25	+
T5	+	15	+	26	+
T6	+	16	+	27	+
T7	+	17	+	28	+
T8	+	18	+	29	-
T9	+	19	+	30	+
T10	-	20	+	31	+
10	+	21	+	32	+

En el 87,8% de la muestra se observa la presencia de *F.circinatum*. Cuatro muestras no mostraron presencia del patógeno sugiriendo que no todas las poblaciones tienen un comportamiento similar. En todo caso es evidente que el patógeno puede sobrevivir un año en el sustrato (Tabla 4.2.2.-2). En la prueba de supervivencia se tiene que *F.circinatum* está presente en ambas clases de tamaño, pero tiende a ser menor en partículas más pequeñas (Tabla 4.2.2-3).

Tabla 4.2.2-3. Presencia de *Fusarium circinatum* sobre sustrato artificialmente inoculado según tamaño de partícula.

Muestra	Presencia <i>F.circinatum</i> (%)	
	Partículas pequeñas	Partículas grandes
T2	35,1	66,7
T6	35,7	60,6
15	20,0	32,1
16	35,7	50,0
25	50,0	85,7
32	10,8	66,7

c) Colonización de partículas

Los resultados de la prueba se presentan en la Tabla 4.2.2-4.

Tabla 4.2.2-4. Resultados de colonización de partículas después de esterilización superficial.

Esterilización	Presencia de <i>F. circinatum</i> (%) en distintos períodos		
	30 días	60 días	90 días
NaClO ₂ 1%	62,4	57,9	40,0
H ₂ O ₂ 30v	0	0	0

Los resultados indicarían que la desinfección con peróxido de hidrógeno es más eficiente en esterilización de *F. circinatum* que hipoclorito de sodio a la dosis y tiempo probados. Siendo ambos productos esterilizantes superficiales, puede inferirse que no habría colonización interna de las partículas por *F.circinatum*. Huang y Kuhlman (1990) obtienen más de 41 géneros diferentes desde partículas tratadas con este desinfectante, algunos de los cuales, como *Penicillium*, son saprofitos, y sus resultados indicarían, asumiendo que el tratamiento superficial fuese efectivo, que *Penicillium* ha colonizado internamente las partículas, del mismo modo que podría hacerlo *Fusarium*.

d) Crecimiento de *F.circinatum* sobre sustrato.

Después de un periodo de matención de tres meses de los tubos con sustrato a temperatura de 24°C se determinó la presencia de *F. circinatum* tanto en la parte central de los cuatro tubos (volumen inoculado) como en la corteza no inoculada de los extremos de los tubos. En el caso de la corteza en los extremos de los tubos, en dos casos se encontró el hongo en ambos extremos y, en los otros, dos sólo un extremo (Tabla 4.2.2-5).

Estos resultados demuestran la enorme capacidad saprofítica de *F.circinatum*. El crecimiento sobre el sustrato estéril desde el volumen inicial hasta el extremo implica el uso necesario de compuestos alimenticios que debe obtener desde el sustrato.

Tabla 4.2.2-5. Presencia de *F. circinatum* en el sustrato de los tubos de PVC.

Tubo	Presencia <i>F.circinatum</i>		
	Extremo lado A	Parte central	Extremo lado B
1	si	Si	si
2	no	Si	si
3	si	Si	no
4	si	Si	si

Puede concluirse entonces que *F.circinatum* sobrevive a lo menos un año sobre sustrato de corteza de pino, sobre el cual puede crecer pero no colonizaría internamente las partículas de corteza.

Literatura consultada

- Huang, J.W. y Kuhlman, E.G. 1990. Fungi associated with damping off of slash pine seedlings in Georgia. *Plant Disease* 74: 27-30.
- Johnson, L.F. y Curl, E.A. 1972. *Methods for research on the ecology of soil borne fungi*. Burgess Publishing Co. N.Y. pp. 247.
- Viljoen, A., Wingfield, M.J. y Marassas, W.F.O. 1994. First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* in pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.
- Wingfield, M.K. 1999. Opinión. p. 68. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) *Current and potential impact of pitch canker in radiata pine*. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.1998.

4.25.NOMBRE DE LA META.

META 2

4.2. Saproogénesis de *F. circinatum*

4.25.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.2.3. Rol de contenedores en permanencia del inóculo de *F. circinatum*.

4.2.3.a. Rol de contenedores como fuente de inóculo primario de *F. circinatum*.

4.2.3.b. Sobrevivencia del inóculo de *F.circinatum* sobre almacigueras y tubotes.

4.2.3.c. Determinación del tipo de inóculo de *F. circinatum* presente en la bandeja o tubete.

4.25.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El papel de los contenedores usados en producción de plantas de especies forestales como fuente de inóculo para nuevas producciones de planta para ha sido establecido para numerosas especies de *Fusarium* y otros patógenos de *Pseudotsuga menziesii*, *Larix occidentalis* y *Picea engelmannii* (James *et al.* 1988, Dumrose *et al.*, 2002) y *Pinus palustris* (Cram, 2002). Puede presumirse que lo mismo debe ocurrir con la producción de *P.radiata* y el patógeno *F.circinatum*. Así Wingfield (1999) indica que el hongo se encuentra comúnmente en bandejas almacigueras de poliestireno expandido, las que se usan comúnmente en el país para la producción de plantas.

Los objetivos de los estudios son determinar si contenedores infestados sirven de inóculo, establecer el grado de supervivencia del eventual inóculo y buscar determinar bajo que forma se encuentra el inóculo.

Material y Método

a) Rol del contenedor como fuente de inóculo primario.

Un número de 48 cavidades de tres bandejas almacigueras de “aislapol” (poliestireno expandido) con cabida total de 112 cavidades fueron inoculadas con pincel con una suspensión de esporas de *F.circinatum* de concentración $1 \cdot 10^6$, a la cual se adicionó 1% de agar. Las restantes 64 cavidades de cada bandeja se dejaron como control no inoculado.

Las bandejas fueron llenadas con substrato de corteza esterilizado en autoclave (121°C, una hora, dos veces) y guardadas en bolsa plástica una semana antes de la siembra.

El mismo procedimiento se siguió con una bandeja portatubetes de pvc flexible.

Las bandejas y almacigueras se mantuvieron en el invernadero donde se ejecutan estudios para el proyecto (CPF, Los Ángeles).

El tratamiento se evaluará por mortalidad y determinación de *F.circinatum* sobre muestras de raíces y tallos de plantas.

b) Sobrevivencia del inóculo.

Este estudio se realizó sobre tubetes utilizados en ensayos de inoculación de *F.circinatum* al substrato, donde hubo 100% de mortalidad. Para cada contenedor el tiempo transcurrido entre su primer uso y este estudio fue de entre tres y cinco meses.

La presencia del inóculo en los contenedores se estableció cortando pequeños segmentos de tubos de pvc flexibles Los segmentos de tubos o almacigueras fueron colocados con la cara interna sobre medio selectivo acidificado en placas Petri.

Un procedimiento similar se aplicó cortando las bandejas de poliestireno expandido de modo de separar las cavidades en dos mitades y extrayendo con sacabocado pequeñas áreas de la cara interior.

c) Determinación del tipo de inóculo.

Desde la cara interna de 5 cavidades se recogió, con pincel rígido, el material adherido a las paredes de las cavidades sobre un vidrio de reloj con 2 mL de agua destilada con floxina a saturación. Este material se pasó por un colador con gasa fina colectándose el líquido en “viales” de 20 mL de capacidad. Del filtrado obtenido de cada uno de las 5 cavidades se hizo 12 preparaciones que fueron observadas al microscopio.

Resultados y Discusión

a) Rol del contenedor como fuente de inóculo.

La alta presencia de inóculo en el ambiente de la sala del invernadero (CPF, Los Angeles) donde se mantuvo el ensayo ocasionó severo ataque de *F.circinatum* en cotiledones y nudo cotiledonario de las plantas, originando una fuente de error que podría alterar los resultados esperados (Tabla 4.2.3-1). Por esta razón, la presencia de *F.circinatum* en las paredes de las cavidades de las bandejas se debieron evaluar por siembra directa en medios selectivo NSM. Las bandejas con plantas sobrevivientes se cambiaron a otro ambiente (sala) donde no había plantas con infecciones que pudieran producir nuevo inóculo.

Tabla 4.2.3-1. Plantas afectadas por infecciones de *F.circinatum* en cotiledones y nudo cotiledonario en sectores con cavidades inoculadas y no inoculadas

Bandeja	Cavidades inoculadas			Cavidades no inoculadas		
	N°	Plantas afectadas	%	N°	Plantas afectadas	%
1	48	19	39,5	64	28	43,8
2	48	23	47,9	64	26	40,1
3	48	27	56,3	64	32	50,0
Tubetes	44	23	52,3	44	26	59,1

Tabla 4.2.3-2. Presencia de *F. circinatum* en cavidades de bandejas inoculadas con el hongo.

Cavidad	Presencia <i>F.circinatum</i>		
	Parte superior	Parte central	Parte inferior
1	Si	No	No
2	No	Si	No
3	No	No	No
4	No	No	No
5	No	No	No
6	Si	Si	No
7	No	No	No
8	No	No	No
9	No	No	No
10	Si	Si	No
11	Si	Si	Si
12	No	No	No
13	Si	No	Si
14	No	No	No
15	No	No	Si
Porcentaje (%)	33,3	26,7	20,0

Si bien, debido a infecciones en cotiledones de las plantas en prueba, no se logró evidencia directa que *F.circinatum* pasara desde las paredes de las cavidades de las bandejas de aislapol a las raíces de los pinos, se tiene la evidencia indirecta que el patógeno agregado se conserva, aunque en baja proporción, en las cavidades inoculadas de las bandejas.

La lectura de plantas que murieron en el nuevo ambiente con síntomas clásicos de *F.circinatum* (marchitamiento y decoloración), diferentes a una infección en follaje, indica presencia del patógeno en porcentajes entre 30 y 60 % de las plantas muertas (Tabla 4.2.3-3).

Tabla 4.2.3-3. Presencia de *F. circinatum* en raíces o tallo basal de plantas muertas con síntomas de marchitamiento en nuevo ambiente.

Contenedor	% con <i>F.circinatum</i>
Bandeja 1	60,0
Bandeja 2	50,0
Bandeja 3	44,4
Tubetes	33,3
Asintomáticas	17,6

Esta situación no es, sin embargo, conclusiva en cuanto que las infecciones por el patógeno se hayan originado desde las paredes del contenedor, aunque sea muy probable, porque no puede descartarse que las conidias existentes en el ambiente de la sala donde originalmente se mantuvo

las plantas hayan caído sobre el substrato y percolado hacia las raíces donde pudieron originar la infección.

b) Supervivencia de *F.circinatum* en tubetes.

La presencia determinada de *F.circinatum* en las paredes interiores de tubos de pvc flexible (Tabla 4.2.3-3), tiene dos implicancias: primero, que *F.circinatum* es capaz de pasar desde el substrato a las paredes del contenedor y segundo, que puede mantenerse en las paredes por hasta 5 meses, período evaluado.

Tabla 4.2.3-4. Supervivencia *F. circinatum* en tubetes donde hubo substrato inoculado.

Tubete	Presencia <i>F.circinatum</i>		
	Parte superior	Parte central	Parte inferior
1	si	Si	no
2	si	Si	no
3	si	No	si
4	no	No	no
5	no	Si	si
6	si	Si	si
7	si	Si	no
8	no	no	no
9	si	Si	no
10	no	No	no
Porcentaje (%)	60	60	30

c) Determinación del tipo de inóculo.

Tabla 4.2.3-5. Presencia de hongos en agua filtrada de residuos de cavidades de las almacigueras.

Cavidad	Preparaciones	<i>Fusarium</i> sp.	Micelio hialino	Otros *
1	12	0	1	3
2	12	0	0	5
3	12	1	0	2
4	12	1	1	3
5	12	0	0	0

* Micelio o esporas dematiaceos, otras esporas.

No fue posible determinar con exactitud el tipo de inóculo presente en las paredes de bandejas de poliestireno expandido. Aun cuando se observasen macroconidias de *Fusarium*, no es posible asegurar que se tratase de *F.circinatum*. Evidentemente, tampoco es posible sostener que los segmentos de micelio hialino observado correspondan a una especie de *Fusarium*. Sin embargo, es

interesante que se haya observado conidias de *Fusarium*, aun cuando escasas, indican la posibilidad que exista propágulos de especies de este género entre las partículas orgánicas adheridas a las paredes de las cavidades de los contenedores.

Literatura consultada

- Cram, M. 2002. Fungi associated with longleaf pine containers before and after cleaning. Pp 84-88 In. Dumrose, R.G.; Riley, L.E.; Landis, T.D. Tech. Coord. National Proc. Forest and Conservation Nursery Associations, 1999, 2000 and 2001. Proc. RMRS-P-24. Ogden, UT:USDA FS, Rocky Mountain Res.Sta.
- Dumrose, R.K., James, R.L. y Wenny, D.L. 2002. Hot water and copper coating in reused container decrease inoculum of *Fusarium* and *Cylindrocarpon* and increase Douglas fir seedling growth. HortScience 37: 943-947.
- James, R.L., Dumrose, R.K. y Wenny, D.L. 1988. Occurrence and Persistence of *Fusarium* within styroblock and ray leach containers. Forest Nursery Proceedings, Vernon, Canada, 1988.

4.26.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.2. Saprogénesis de *F. circinatum*

4.26.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.4.4. Rol de plantas muertas de *P. radiata* en viveros o plantación.

4.2.4.a. Determinación de la extensión de la colonización de *F. circinatum*.

4.2.4.b. Determinación de la duración de la colonización de *F. circinatum*.

4.2.4.b.1. Supervivencia de *F.circinatum* sobre plantas con más de un año del ataque y posibilidad.

4.26.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Las plantas muertas por *Fusarium circinatum* en viveros son normalmente eliminadas desde las áreas de producción y enterradas o quemadas para evitar la formación de inóculo. Empero, las plantas que ocasionalmente mueren en la plantación no son eliminadas y sobre ellas pueden eventualmente producirse esporodoquios que formen nuevo inóculo, que sería la situación normal de propagación del patógeno. Además, varios autores indican que *F.circinatum* sobrevive en astillas o desechos infectados (Owen y Adams, 1999; Templeton *et al.*, 1999; Blakeslee, 1999) y Gordon *et al.* (2001) indican que ramas u otros desechos, así como trozas y astillas infectadas servirían a la diseminación de la enfermedad. Sin embargo, las recomendaciones actualmente aplicadas en California para evitar dispersión del cancro resinoso establecen astillar los árboles y usarlos como “mulch” o compostarlos (CDF, 2003).

Este punto merece mayor atención puesto que la existencia del patógeno en los tejidos de la planta (astillada o no) no significa necesariamente que ese material sea fuente de contagio, excepto que

exista capacidad en el patógeno de producir esporas sobre ese material, o que el micelio permanezca activo y sea capaz de alcanzar a una planta cercana. No se conoce la capacidad de producir sucesivas cosechas de esporodoquios en *F.circinatum*, de modo que una planta muerta sea una fuente permanente de inóculo, lo más probable es que los produzca solamente una temporada y luego el hongo sobreviva de algún modo en los tejidos colonizados del cancro pero no se reproduzca.

Los objetivos de estos estudios son conocer sobre la distribución de *F.circinatum* en los tejidos de la planta, cuanto tiempo permanece activo en los tejidos y evaluar la capacidad de los tejidos colonizados de servir de inóculo para producir enfermedad.

Material y Método.

a) Determinación de la extensión de la colonización.

La extensión de la colonización se realizó sobre 7 plantas enfermas en terreno (Huinganal) y 6 plantas madres de un huerto de setos (Vivero Carlos Douglas) que mostraban un cancro claramente definido en la base del tallo. En cada planta se desprendió la corteza para exponer el cancro. Se tomó muestras desde el cancro y su borde y luego cada 2 cm hasta 10 cm fuera del cancro. Las astillas de madera obtenidas fueron esterilizadas en solución 1% de hipoclorito de sodio durante 3 minutos y luego sembradas en medio selectivo NSM.

b) Determinación de la duración de la colonización.

Se realizó muestreos periódicos de plantas mayores de 2 años (predio Huinganal, vivero Carlos Douglas), con cancro definido y mantenidas en laboratorio, tomando astillas desde cancos. Las astillas fueron esterilizadas en solución 1% hipoclorito de sodio por tres minutos.

c) Evaluación de la capacidad de tejidos infectados para servir de contagio de la enfermedad.

Este estudio corresponde a uno nuevo, no incluido en el programa de trabajo inicial y busca aclarar algunos conceptos sobre el rol del substrato en la ocurrencia de ataques a plantas producidas a ría cubierta.

Plantas muertas por *F.circinatum* en estudios realizados en el año 2004 y mantenidos en laboratorio, así como secciones de plantas muertas en plantaciones bajo observación (Huinganal) fueron trituradas en molino. Ese material fue mezclado con suelo esterilizado y usado para llenar vasos de papel encerado de 300 mL de capacidad que se sembraron con *P.radiata*. Las semillas fueron desinfectadas con H₂O₂ durante 15 minutos.

En este estudio también se probó si el suelo y arena del estudio 4.2.1 (Duración del inóculo en el suelo) después de 20 meses enterrado era capaz de provocar la enfermedad.

Los tratamientos se describen en la Tabla 4.2.4-1.

Tabla 4.2.4-1. Descripción de los tratamientos empleados en el estudio.

Tratamiento	Descripción
S	Suelo de un vivero forestal
EF	Suelo esterilizado e inoculado con triturado de plantas afectadas
MOR	Arena de estudio 4.2.1
EI	Suelo esterilizado e inoculado con suspensión de esporas ($1 \cdot 10^4$)
MO	Suelo de estudio 4.2.1
SF	Suelo inoculado con triturado de plantas afectadas por <i>F. circinatum</i>

Después de tres semanas de la siembra se realizó una evaluación semanal de la emergencia y caída de plantas hasta completar las 6 semanas desde la siembra. Las plantas muertas cortadas en secciones, lavadas y colocadas en agua y en medio selectivo para *Fusarium*.

Resultados y Discusión

a) Determinación de la extensión de la colonización.

En ninguna de las trece plantas evaluadas *F.circinatum* fue encontrado más allá del borde del cancro; en todas las plantas el hongo se encontró confinado al cancro (Figura 4.2.4-1). Este resultado puede considerarse opuesto al obtenido en el estudio del efecto de la época de inoculación (Estudio 4.1.1) donde se observó que el patógeno avanzaba desde el punto de inoculación subápical hacia la base del tallo. Básicamente, la diferencia estriba en que en las inoculaciones subápicales el hongo avanza en tejidos no lignificados como un cancro difuso. Dwinell (1978) señala que en inoculaciones en ápices de *P.elliottii* var. *elliottii* fue posible aislar el hongo hasta 12 mm sobre y bajo la lesión en torno al punto de inoculación, pero en *P.taeda*, donde se formó un cancro definido, el hongo se aisló solamente hasta los bordes del cancro.

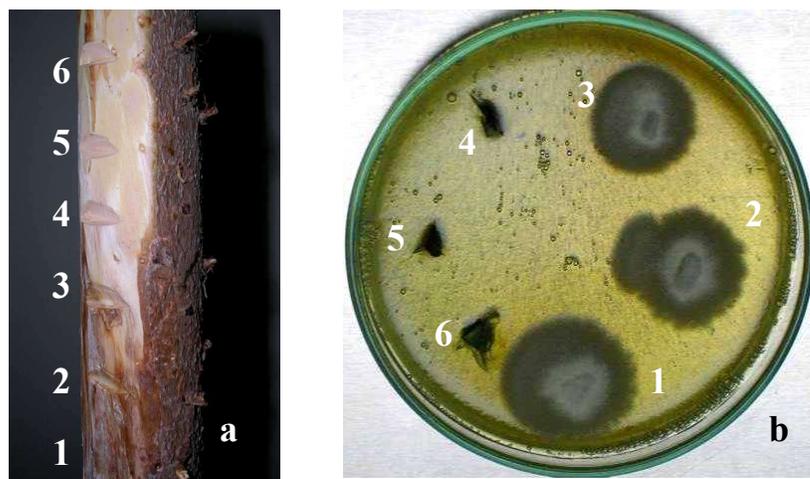


Figura 4.2.4-1. a). Puntos de obtención de las astillas de muestra. b). cultivo desde las astillas obtenidas.

b) Determinación de la duración de la colonización.

Todos los muestreos sobre plantas que presentaban síntomas y canchros en terreno (Huinganal) fueron positivos a 5 y 12 meses, por lo que puede establecerse que *F.circinatum* sobrevive un año en los tejidos infectados (canchros). En otro material, sobre plantas jóvenes (18 meses) inoculadas y mantenidas en bolsa de papel en ambiente de laboratorio, el hongo sobrevive más de 24 meses.

c) Evaluación de la capacidad de tejidos infectados para servir de contagio de la enfermedad.

En todos los tratamientos evaluados se observó caída de plantas, sin embargo, en el suelo sin inoculación (S) no se observó caída por *F. circinatum* pero sí por otros organismos. En el estudio se observó caída de plantas por *Pythium* y otras especies de *Fusarium*.

Tabla 4.2.4-2. Caída de plantas y sobrevivencia al término del estudio.

Tratamiento	Damping off por <i>Fusarium circinatum</i>		Sobrevivencia *
	Pre-emergencia *	Post –emergencia *	
S	0,0 a	0,0 a	84,6 a
EF	62,5 b	89,6 c	10,4 c
MOR	0,0 a	12,0 b	23,3 b
EI	65,0 b	100,0 c	0,0 c
MO	67,0 b	93,5 c	5,8 c
SF	50,5 b	83,3 c	8,3 c

* Medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

Los tratamientos de muestras de suelo (MO) y arena (MOR) mantenidos por 20 meses enterrados en el suelo y almacenados en laboratorio por otros 4 meses adicionales fueron capaces de causar muerte de plantas. En el caso de la arena (MOR) del estudio 4.2.1 sólo presentó caída de post emergencia (Tabla 4.2.4-2), a pesar que en las últimas evaluaciones de este tipo de material se había encontrado muy baja cantidad de unidades formadoras de colonia de *F. circinatum* (Estudio 4.2.1).

El tratamiento con triturados de plantas muertas por *F.circinatum* (SF) adicionados al suelo originó alto porcentaje de mortalidad asociada al patógeno. Este resultado indica que *F.circinatum* se mantiene vivo sobre tejidos muertos durante plazos superiores a dos años y es capaz de activarse de modo de actuar como inóculo para nuevas infecciones.

Literatura consultada

- Blakeslee, G.M. 1999. Opinión, p.39. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA., 30 Nov. to 3 Dec. 1998.
- California Department of Forestry and Fire Protection. 2003. Guidelines for Christmas Tree Purchase and Disposal to Protect California Pines. CDF News Release.
http://frap.cdf.ca.gov/pitch_canker/
- Dwinell, L.D. 1978. Susceptibility of Southern Pines to Infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Plant Disease Reporter 62: 108-111.

- Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128-1139.
- Owen, D.R. y Adams, D.H. 1999. Overview of Pitch Canker in California. Pp 21-24.
- Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA., 30 Nov. to 3 Dec. 1998.
- Templeton, S.R., Storer, A.J., Wood, D.L., Gordon, T.R. y Wright, B.D. 1999. Economic Damage of Pitch Canker and Risk Reduction Policies. Pp.25-26. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA., 30 Nov. to 3 Dec. 1998.

4.27.NOMBRE DE LA META.

META 2

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*.

4.27.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.1. Presencia de *F. circinatum* sobre brotes en plantas de jardín de setos.

4.27.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La ocurrencia de muerte de plantas provenientes de estacas recientemente enraizadas en viveros ha llevado a postular que las estacas podrían estar infectadas al momento de la plantación o contener el hongo desde la planta madre. No hay evidencia en la literatura consultada que *F.circinatum* se redistribuya o afecte en forma sistémica a la planta. Hepting (1954) indica que el hongo se extiende escasamente paralelo el eje del tallo en *P.virginiana*, y Dwinell (1978), que las inoculaciones al ápice se detienen en el primer nudo. Barrows-Broadus y Dwinell (1983) señalan que el mayor porcentaje de recuperación del hongo inoculado ocurre próximo al punto de inoculación, el hongo avanza por espacios intercelulares.

Material y Método

Se colectó en plantaciones 16 plantas que presentaban síntomas iniciales atribuibles a *F.circinatum*, como decoloración del follaje, marchitez incipiente o canchales en la base del tallo. Las plantas fueron traídas a laboratorio para confirmar separadamente la presencia del patógeno en lesiones en el cuello y en los ápices marchitos o de color verde claro. Posteriormente, este procedimiento se cumplió tomando 2 brotes en cada una de 5 plantas madre establecidas en el vivero Carlos Douglas.

Cada ápice fue dividido en tres partes y desde cada una se obtuvo una pequeña sección que fue esterilizada superficialmente con hipoclorito de sodio 1% mL-1 y sembrada en medio selectivo NSM. Igualmente, muestras desde los canchales fueron esterilizadas y sembradas en medio NSM.

Resultados y Discusión

Ningún brote de plantas afectadas por *F. circinatum* en la base del tallo presenta infecciones inactivas o latentes del patógeno en los brotes.

La ocurrencia de ataque de *F. circinatum* en ápices de plantas corresponde a infecciones locales, originadas principalmente por heridas que sirven de avenida de entrada de inóculo aéreo, y no a infecciones en el cuello de la planta o canchros en el tallo inferior como ocurre corrientemente en plantaciones.

Literatura consultada

- Barrows-Broadus J. y Dwinell, L.D. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in Four Species of Southern Pines. *Phytopathology* 73: 882-889.
- Dwinell, L.D. 1978. Susceptibility of Southern Pines to Infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Disease Reporter* 62: 18-111.
- Hepting, G.H. 1954. Gum flow and pitch canker in Virginia pine following *Fusarium* inoculations. US Dep. Agr. For. Ser. Stn. Paper 40. 10 pp.

4.28.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.28.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.2. Distribución de la enfermedad en el jardín de setos.

4.3.3. Avance de la enfermedad en jardín de setos establecido a raíz desnuda.

4.3.4. Distribución del inóculo de *F. circinatum* en jardín de setos.

4.28.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El inóculo de *F. circinatum* en epidemias de cancro resinoso en plantaciones o en bosques naturales de pinos se encuentra en el aire (Schmidt y Underhill, 1974; Kuhlman *et al.*, 1982; Correll *et al.* 1991) o asociado a insectos que se mueven en ese medio (Sakamoto *et al.* 2001; Gordon *et al.* 2001; Sakamoto y Gordon, 2004; Storer *et al.* 2004).

En Chile, sin embargo, la enfermedad se comporta como una que se propaga también por el suelo, como habría ocurrido en los cultivos de pinos de Pascua en California (Gordon *et al.* 2001).

Las infecciones en las plantas madres en el vivero Carlos Douglas ocurren como infecciones en el cuello de las plantas sugiriendo infecciones de raíz que permitirían el avance del patógeno hacia el tallo por los espacios intercelulares del cortex (Barrows-Broadus y Dwinell, 1983). Por esta razón se buscó determinar la presencia de inóculo de *F. circinatum* en el suelo donde hubo plantas con síntomas atribuibles a este patógeno.

Este trabajo forma parte de los estudios sobre muerte de plantas madres en un huerto de setos realizados por don Miguel Castillo S., como parte de su Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales.

Material y Método.

En cada una de tres parcelas permanentes de observación (UPO) (Estudio 4.3.2), se seleccionaron 3 plantas que mostraban síntomas de clorosis, marchitez, y canchales en el cuello. Estas plantas fueron arrancadas y el punto donde se encontraba su eje vertical fue marcado con una estaca, punto que se consideró punto 0 de la muestra. Teniendo este punto como centro, se trazó dos líneas perpendiculares sobre las cuales se tomó muestras de suelo a 0,2; 0,5; 1 y 2 m y hasta 30 cm de profundidad. Las muestras correspondientes a una misma distancia conformaron una muestra compuesta.

Las muestras de suelo fueron tamizadas (2 mm) y 25 gr. se agregaron a 250 mL de agua destilada esterilizada y agitadas durante 30 minutos. Luego una alícuota se diluyó 1:100 para tomar 0,5 mL que se colocaron en placas Petri (cuatro) con medios selectivos NSM (Seifert 1996) o Rosa Bengala (Johnson *et al.* 1972).

Los cultivos se incubaron a 23°C por una semana, identificadas las colonias y determinadas las unidades formadoras de colonia.

Resultados y Discusión

Los organismos aislados desde las plantas fueron *Macrophomina phaseolina* y *Sphaeropsis sapinea* y en el suelo en las tres unidades de observación fueron *M.phaseolina*: promedio 29 ufc gr⁻¹, *S. sapinea* con cantidad de ufc indeterminada por ser excesivamente numerosas en las placas; *Phytophthora* spp.: 37 ufc gr⁻¹; y *Fusarium* spp. 118 ufc gr⁻¹, pero no se aisló *F.circinatum* (Tabla 4.3.4-1) (Castillo, 2005).

La ausencia de *F.circinatum* en el suelo puede relacionarse con un origen externo al huerto de setos de la enfermedad en los pocos casos de aislamientos positivos de este patógeno (Tabla 4.3.4-2), es decir, puede considerarse que las plantas ingresaron enfermas pero asintomáticas a la plantación.

Tabla 4.3.4-1. Densidad de inóculo (ufc/gramo) en el suelo vecino a plantas enfermas.

Unidad de observación	Distancia (metros)	Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo		
		<i>Fusarium</i> spp	<i>M. phaseolina</i>	<i>Phytophthora</i> sp.

1	0	128	4	48
	0,2	164	32	32
	0,5	116	24	36
	1	192	28	60
	2	148	48	20
2	0	160	12	28
	0,2	116	32	44
	0,5	148	40	80
	1	200	40	80
	2	96	24	56
3	0	168	12	100
	0,2	200	28	60
	0,5	112	80	44
	1	132	32	16
	2	72	60	52

Tal como se mencionó más arriba, no se incluye en la tabla la cantidad de ufc de *S.sapinea*, dado que el alto número y por ende el contacto o superimposición entre colonias hacía imposible el recuento

Es altamente probable que las plantas enfermas por *F.circinatum* no alcancen a producir esporas en el huerto, donde es práctica necesaria y rutinaria retirar las plantas moribundas. En este caso, las plantas se habrían retirado antes de finalizar el período latente de la enfermedad.

Tabla 4.3.4-2. Incidencia de patógenos aislados desde plantas madres marchitas o muertas, obtenidas en muestreos sistemáticos y no sistemáticos en la UPO.

UPO	Plantas Diagnosticadas (N°)	Incidencia (%)			
		<i>Sphaeropsis sapinea</i>	<i>Macrophomin a phaseolina</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium circinatum</i>
1	18	50	28	6	11
2	17	47	29	6	6
3	15	53	33	13	0
Total	50	50	30	8	6

La incidencia de *F.circinatum* es la más baja de los patógenos determinados sobre las plantas con síntomas en las unidades de observación. Este resultado puede deberse a que las plantas están en su tercer y cuarto año de establecimiento como plantas madres, la mayor mortalidad asociada a *F.circinatum* debió producirse en los primeros años, como la evidencia lograda en otros estudios lo indica (Estudios 4.3.2 y 4.3.3), las plantas ingresan enfermas pero sin síntomas a la plantación del huerto.

Literatura consultada

- Barrows-Braddus, J. y Dwinell, L.D. 1983. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in four species of southern pines. *Phytopathology* 75: 1104-1108.
- Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S., Wood, D.L. y Schlutz, M.E. 1981. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*) *Plant Disease* 75: 676-682.
- Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease* 85: 1128-1139.
- Kuhlman, E.G., Dianis, S.D. y Smith, T.K. 1982. Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard in North Carolina. *Phytopathology* 72: 1212-1216.
- Sakamoto, J. Y Gordon, T.R. 2004. Colonization of Monterey pine (*Pinus radiata*) branches by twig beetles (*Pityosporus* spp) (Coleoptera: Scolytidae) in native stands affected by pitch canker in Pebble Beach, CA. Entomological Society of America. Annual Meeting, Nov. 16. 2004.
- Schmidt, R.A., y Underhill, E.M. 1974. Incidence and impact of pitch canker in slash pine plantation in Florida. *Plant Disease Reporter* 58: 451-454.
- Storer, A.J., Wood, D.L. y Gordon, T.R. 2004. Twig beetles, *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) as vectors of the pitch canker pathogen in California. *The Canadian Entomologist* 136: 685-693.

4.29.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.29.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.5. Distribución del problema en plantaciones de *P. radiata* con determinación positiva.

4.29.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

Es sabido que la enfermedad se disemina a plantaciones desde viveros con presencia de ataques de *F.circinatum*. (Gordon 1999, Wingfield 1999, Gordon *et al.* 2001). Esto ocurre porque plantas infectadas tardíamente por el patógeno en el vivero, no alcanzan a mostrar síntomas antes de la extracción y la enfermedad se desarrollará luego en la plantación.

En esta situación importa conocer si las plantas enfermas o muertas en terreno significan un contagio para otras plantas vecinas o si la muerte de nuevas plantas no se relaciona con las muertas con anterioridad.

Material y Método.

Originalmente, en este estudio se establecía la instalación de parcelas para la evaluación del eventual avance de la enfermedad en plantaciones recientes de pino a partir de una primera planta

enferma en la plantación. Se asumía que encontrar plantas afectadas en una plantación no sería frecuente. Sin embargo, la ocurrencia de plantaciones con alto número de plantas afectadas por *F.circinatum* ha permitido cambiar el sistema de trabajo y usar parcelas de aproximadamente 1 ha, con más de 100 plantas afectadas, facilitando el trabajo de seguimiento del curso de la enfermedad en la población existente y disminuyendo el costo del estudio.

Este estudio está ubicado en el predio Huinganal, de Forestal Celco, en plantación 2003, donde se observa alta mortalidad de plantas. Esta situación permitió simplificar enormemente el diseño establecido originalmente para el seguimiento del curso de la mortalidad en el rodal. De este modo, se demarcaron dos parcelas de 25 hileras espaciadas 4 m. por 50 plantas sobre la hilera, con una cabida total teórica de 1.250 plantas cada una. Una parcela, denominada Parcela 1, se usó para determinar el avance de la mortalidad y en la otra (Parcela 2) se extrajo las plantas afectadas para replantar, sin perjuicio de lo cual se efectuaron recuentos de plantas muertas en forma periódica. En el primer recuento se realizó con personal capacitado de Forestal Celco para realizar las prospecciones de presencia de *F.circinatum* en plantaciones y se estimó como plantas muertas por *F.circinatum* solamente aquellas que mostraban algún crecimiento en la plantación antes de su muerte y cuyas acículas o ápices muertos indicaban haber sufrido marchitamiento, distinguiendo así la muerte por cancro resinoso de muerte de plantas por mala plantación o por fitotoxicidad del herbicida aplicado meses antes.

Resultados y Discusión.

Las plantas muertas en las parcelas de observación mostraban síntomas de clorosis y marchitamiento, excepto algunos casos donde no hubo clorosis sino marcada opacidad en el color del follaje antes de la marchitez y muerte. Todos los casos de plantas sospechosas fueron confirmados en laboratorio por aislamiento del patógeno.

En censo efectuado en la parcela 1 en Marzo 2005 se determinó 26, 8% de mortalidad y de esta mortalidad el 60,9% fue atribuible a *F.circinatum*. Es decir 16,3% de mortalidad sobre la plantación original.

La mortalidad observada en las parcelas se muestra en la Tabla 4.3.5-1.

Tabla 4.3.5-1. Mortalidad de plantas en rodal 2003, Huinganal.

Mes	Mortalidad acumulada	
	Parcela 1	Parcela 2

Junio 2004	126	146
Agosto 2004	192	178
Septiembre 2004	192	196
Noviembre 2004	199	210
Enero 2005	202	215
Marzo 2005	204	215
Mayo 2005	204	217
Agosto 2005	205	218
Octubre 2005	205	223
Enero 2006	206	223
Marzo 2006	208	223
Junio 2006	208	224
Septiembre 2006	208	224
Diciembre 2006	208	224
Abril 2007	209	224
% pérdida	16,3	17,9

La mortalidad en la parcela 2 alcanzó a 17,9%.

La incidencia final promedio es de 17,3 %.

La enfermedad ocurre en la plantación en forma muy espaciada en el tiempo de modo que algunas plantas mostraron síntomas hasta tres años y meses desde que fueron plantadas. En el cultivo de *P.radiata* para árboles de Pascua en California, se señala que plantines infectados pueden sobrevivir por muchos meses y quizá años sin mostrar síntomas (Anónimo, s.f.). Este tipo de comportamiento puede deberse a lo que se ha denominado infecciones inactivas (Barrows-Broaddus y Dwinell, 1983) donde el hongo permanece vivo pero sin avanzar más allá de la zona de inoculación hasta que ocurre un evento que lo activa, o también a que, para causar la muerte de la planta, *F.circinatum* requiera circundar como cancro todo el tallo, avance que significa tiempo, especialmente si hubiere habido reacciones de defensa de la planta que limitan el avance del patógeno.

Las plantas muertas en terreno siempre mostraron resinación y canchros a la altura del cuello de la planta, no se observó infecciones en ramas o ápices que pudieran significar transmisión horizontal de la enfermedad. El incremento de la enfermedad es claramente descendente a medida que avanza el tiempo lo que también sugiere una dependencia de su ocurrencia de la cantidad de inóculo inicial. Es decir, ausencia de multiplicación interna del inóculo, pudiendo atribuirse el origen de enfermedad a infecciones ocurridas en vivero.

En algunas escasas plantas muertas en terreno pudo observarse esporodoquios, y aunque el número de plantas que los presentaron no fue alto, tres en el estudio, la presencia de estas estructuras reproductivas del patógeno indican que el inóculo se produce en plantaciones que albergan plantas afectadas desde el vivero por *F.circinatum*.

Literatura consultada

Barrows-Broaddus, J. y Dwinell, L.D. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* four species of southern pines. *Phytopathology* 75: 1104-1108.

Gordon, T.R. Opinion, p.68. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.

Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85: 1128-1139.

Wingfield, M.J.1999. Opinion, p.68. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.

4.30.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.30.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.6. Asociación de *F. circinatum* con otros patógenos.

4.3.6.a. Inoculación al suelo.

4.3.6.b. Inoculación de cuello.

4.30.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Varios aislamientos desde plantas inoculadas con *F.circinatum* mostraron la presencia conjunta en una planta de este patógeno y *Sphaeropsis sapinea*. (Arevalo, 2002) En otras ocasiones, en plantas naturalmente infectadas se ha aislado *F.circinatum* en tallo y *Phytophthora* sp. o *Macophomina phaseolina* desde raíces.

El rol preciso de estos otros organismos no queda establecido y no se encontró información sobre infecciones mezcladas en la literatura revisada.

Con el objetivo de determinar la existencia de esta eventual asociación, además de ampliar los diagnósticos desde plantas sospechosas, se realizaron pruebas de inoculación cruzada de *F.circinatum* con *S.sapinea* e inoculaciones al suelo con combinaciones de *F.circinatum* con *Phytophthora cinnamomi* y con *M.phaseolina*.

Material y método.

Estudios 4.3.6.a y 4.3.6.c Inoculación al suelo de *F. circinatum*, *Phytophthora* sp. y *M. phaseolina*.

Maceteros de 2,5 L fueron llenados con suelo que previamente había sido tratado con formalina (2 %), posteriormente fueron inoculados con *F. circinatum*, *Phytophthora* sp. y *M. phaseolina* (Tabla 4.3.6-1). Después, se transplantaron a los maceteros, plantas producidas a raíz cubierta de aproximadamente 6 meses y se dejaron crecer, con riego permanente, durante 3 meses. Se realizaron observaciones periódicas para detectar plantas afectadas y al término del ensayo las plantas sanas y con síntomas se trasladaron a laboratorio para realizar aislamientos desde las raíces

en medio selectivo para *Fusarium* y APD con el objeto de determinar la presencia de los hongos aplicados al suelo. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones.

La baja cantidad de inóculo disponible en el proyecto de *Phytophthora* sp. y *M. phaseolina* no permitieron aplicar el diseño original de combinación de dosis de inóculo para las distintas especies, por lo que se prefirió usar una sola dosis para cada especie fungosa a inocular.

Tabla 4.3.6-1. Tratamientos empleados en inoculaciones al suelo.

Tratamiento	Descripción
<i>M. phaseolina</i> (M)	Esclerocios de <i>M. phaseolina</i> (100 esclerocios/g suelo)
<i>Phytophthora</i> sp. (P)	Harina inoculada con <i>Phytophthora</i> sp. (100 mg/g suelo)
<i>F. circinatum</i> (Fc)	Harina inoculada con <i>F. circinatum</i> (100 mg/g suelo)
Fc + M	Mezcla de <i>F. circinatum</i> con <i>M. phaseolina</i>
Fc + P	Mezcla de <i>F. circinatum</i> con <i>Phytophthora</i>
Fc+ M + P	Mezcla de <i>F. circinatum</i> con <i>M. phaseolina</i> y <i>Phytophthora</i>

Estudios 4.3.6.b Inoculación de *F. circinatum* con *S. sapinea*.

Plantas de 2 años creciendo en maceteros fueron inoculadas en el tallo para determinar el efecto de *F. circinatum* y *S. sapinea* en el desarrollo de la enfermedad. El método de inoculación fue discos de micelio de cultivos en APD de 7 días edad para *F. circinatum* se empleó la cepa 4641 y el cultivo de *S. sapinea* se obtuvo desde picnidios en ramas de pino afectadas por el hongo. Los tratamientos se describen en la tabla 4.3.6-1. Para realizar la inoculación, se realizó un lesión en el tallo de las plantas con sacabocados y se colocó el disco de APD según los tratamientos con la zona de crecimiento del hongo hacia el interior de la herida, posteriormente se cubrió con parafilm. El ensayo se instaló en el vivero CDP y periódicamente se revisó para detectar plantas con síntomas.

Tabla 4.3.6-2. Tratamientos empleados en inoculaciones de *F. circinatum* y *S. sapinea*.

Tratamiento	Descripción
Testigo	Inoculación con disco de APD
<i>F. circinatum</i>	Inoculación con <i>F. circinatum</i>
<i>S. sapinea</i>	Inoculación con <i>S. sapinea</i>
<i>F. circinatum</i> + <i>S. sapinea</i> 1	Inoculación con <i>F. circinatum</i> y <i>S. sapinea</i> en un sólo punto
<i>F. circinatum</i> + <i>S. sapinea</i> 2	Inoculación con <i>F. circinatum</i> y <i>S. sapinea</i> en dos puntos diferentes

Después de 2,5 meses de incubación las plantas se cortaron y se transportaron a laboratorio donde se evaluó la presencia de canchros realizando incisiones a lo largo del tallo en el punto de

inoculación, además se realizaron aislamientos para determinar el agente que estaba causando los canchros.

Resultados.

Estudios 4.3.6.a y 4.3.6.c Inoculación al suelo de *F. circinatum*, *Phytophthora* sp. y *M. phaseolina*. Al término del ensayo solamente se produjo la muerte de una planta y sólo dos presentaban marchitamiento. Al realizar los aislamientos desde las raíces tanto de las plantas con y sin síntomas se encontró presencia de los hongos inoculados (Tabla 4.3.6-3).

Tabla 4.3.6-3. Presencia de hongos en raíces de plantas con (S) y sin síntomas (A).

Tratamiento	Plantas con presencia de:					
	<i>F. circinatum</i>		<i>M. phaseolina</i>		<i>Phytophthora</i> sp.	
	S	A	S	A	S	A
M	0	0	0	3	0	0
P	0	0	0	0	0	1
Fc	0	2	0	0	0	0
Fc + M	2	0	0	2	0	0
Fc + P	0	3	0	0	0	2
Fc+ M + P	1	3	0	1	0	1

La presencia de patógenos de raíces, como *M.phaseolina* y *Phytophthora* sp, en raíces de plantas sin síntomas es frecuente, pues estos hongos colonizan algunas raíces y avanzan a otras o hacia el cuello de la planta en forma muy lenta en plantas sanas o mantenidas bajo condiciones normales. El avance de los patógenos cambia dramáticamente si existiese un factor que signifique estrés para la planta, como son estrés hídrico o alta temperatura para *M.phaseolina* o exceso de agua para *Phytophthora* sp. En el estudio no se produjo ninguno de estos tipos de estrés y tal situación pudo haber operado en contra de un desarrollo mayor de las enfermedades. En cualquier caso, los tres patógenos inoculados pueden colonizar simultáneamente el sistema radical de una planta de pino.

Estudios 4.3.6.b Inoculación de *F. circinatum* con *S. sapinea*:

Se encontró que tanto *F. circinatum* como *S. sapinea* provocaron canchros en la plantas inoculadas, sin embargo, al inocular los dos hongos en un mismo punto, sólo se logró aislar *F.circinatum* y al inocular en dos puntos opuestos a la misma altura del tallo en la mayoría de los casos se aisló *F. circinatum* (Tabla 4.3.4)

Tabla 4.3.6-4. Presencia de *F. circinatum* y *S.sapinea* en las plantas inoculadas.

Tratamiento	Plantas con aislamientos positivos a:		Plantas sanas
	<i>S. sapinea</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	

Testigo	2	0	20
<i>F. circinatum</i>		15	0
<i>S. sapinea</i>	16	0	0
<i>F. circinatum</i> + <i>S. sapinea</i> 1	0	8	0
<i>F. circinatum</i> + <i>S. sapinea</i> 2	2*	14	0

* En estas plantas se aislaron ambos hongos.

Es posible que en las infecciones mezcladas, los discos de *F.circinatum*, hayan contenido conidias y la inoculación resulta como la suma de muchas inoculaciones sobrepasando el tejido disponible no dejando espacio al crecimiento mas lento, inculo solo de micelio de *S.sapinea* que no esporula en medios de cultivo. No es probable que *F.circinatum* posea algún compuesto que haya anulado el crecimiento de *S.sapinea*. Probablemente, los hallazgos de infecciones mezcladas de *S.sapinea* y *F.circinatum* debieron haberse originado por una colonización como endófito de *S.sapinea* muy anterior al ingreso de *F.circinatum* como patógeno.

4.31.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.31.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.7. Rol insectos en la presencia de la enfermedad.

4.3.7.a. Rol de *Rhyacionia buoliana*.

4.3.7.a.1. Implante de larvas de *R. buoliana* inoculadas con *F. circinatum*.

4.3.7.a.2. Implante de larvas de *R.buoliana* en brotes inoculados con *F.circinatum*.

4.3.7.a.3. Determinación de *F. circinatum* sobre brotes de pino muertos por ataques de *R. buoliana*.

4.31.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

El rol de insectos como vectores de *F.circinatum* ha quedado demostrado en estudios realizados en California (Sakamoto *et al.* 2002, Storer *et al.* 2002). El papel de *Rhyaciona fustrana* o *R.bouliana* en la ocurrencia de cancro resinoso ha sido considerado por algunos autores. Stegall (1966) no considera a las “polillas del brote” como vector pero si que las mordeduras de las larvas podrían servir como puntos de entrada del patógeno (Schmidt y Underhill, 1974; Kuhlman *et al.*1982; Dwinell *et al.*1985). Runion (1994) indica la existencia de una correlación positiva entre el daño de polillas del brote (*Rhyaciona* spp) y *Fusarium subglutinans* (= *F.circinatum*). El hongo fue aislado en el 91% de los brotes que mostraban daño de polilla y desde el 70% de las pupas y cerca del 50% de las larvas de *Rhyaciona* spp.

Con el objetivo de determinar una eventual asociación entre *R.bouliana* y *F.circinatum* en el país se realizó estudios de implante de larvas inoculadas (Estudio 4.3.7.a.1), de implante de larvas no inoculadas en brotes de pino inoculados (Estudio 4.3.7.a.2) y determinación de presencia en brotes atacados por polilla para evaluar la posible presencia de *F.circinatum* en ellos (Estudio 4.3.7.a.3).

En este informe se incluyen resultados de los tres estudios sobre el posible papel de *R.bouliana* en la epidemiología de *F.circinatum* en el país.

Material y método.

a) Implante de larvas inoculadas.

Este estudio estaba originalmente planificado para llevarse a cabo en plantaciones, pero la resolución SAG sobre *F.circinatum* obligó a diseñar el estudio sobre plantas de vivero mantenidas en tubetes en invernadero por un año o usar plantas de más edad transplantadas desde terreno a maceteros.

Las larvas de *R.bouliana* fueron colectadas en terreno y criadas en los laboratorios de la Controladora de Plagas Forestales, en Los Ángeles.

El inóculo de *F.circinatum* (1×10^5 mL⁻¹) se preparó en medio líquido (Anderson, 1986) que se asperjó o esparció con pincel sobre las larvas utilizadas en el estudio, mantenidas en frasco cristizador.

En la misma oportunidad se inoculó plantas con *F.circinatum*, en algunas de ellas se implantó polillas no inoculadas y otras se dejaron sin incluir larvas de polilla. En un cuarto lote de plantas se implantó solamente larvas de polilla sin inoculación del patógeno.

En cada brote de las plantas a implantar se depositó dos larvas de polilla y el brote se cubrió de inmediato con una bolsa de plástico transparente. Las bolsas se retiraron a las dos semanas y los brotes fueron cosechados doce semanas más tarde, colocados en bolsas de papel y llevados a laboratorio para determinar presencia de *F.circinatum* en ellos usando medio selectivo NSM.

b) Implante de larvas en brotes inoculados.

Este estudio (4.3.7.a.2) se realizó como un tratamiento del estudio anterior (4.3.7.a.1) y al igual que el estudio anterior, éste estaba planificado para realizarse en una plantación y se debió realizar sobre plantas traídas desde el vivero Carlos Douglas.

En este caso, inóculo preparado de forma igual a la señalada en el punto anterior, fue asperjado en los ápices y tallo superior de las plantas, luego se depositó dos larvas no inoculadas por cada ápice disponible y el ápice fue de inmediato cubierto por una bolsa plástica.

c) Determinación de *F.circinatum* sobre brotes de pino muertos por polilla del brote.

Se tomó muestras de plantaciones en predios Tapihue, Peñuelas (12/01/04) Misque y Parcela 10 Misque (22/01/04), colectando un mínimo de 20 brotes por lugar, correspondientes a ataques de la primavera inmediatamente anterior.

Para el primer muestreo, (12/01) la mitad de los brotes se recortó, limpió de acículas, se esterilizó superficialmente con NaHClO (1% por 3 minutos) y se colocó en cámara húmeda individual, confeccionada con frascos y selladas con "parafilm". La otra mitad se dividió longitudinalmente en cuartos desde el corte hecho por el insecto y se preparó secciones de ca. 1 cm de largo que se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio 1% y pasaron a medio selectivo NSM y mantenidas a 22°C en cámaras de cultivo.

Para el muestreo del 22/01/04 se preparó igualmente 10 brotes para cámara húmeda pero con los brotes para cultivo se decidió realizar una comparación entre la técnica de aislamiento directo, que consume muchas placas pero puede mostrar organismos colonizando los tejidos (endófitos), y la de preparación de una suspensión desde el material picado, que, si bien economiza placas, solo es eficiente en recuperar propágulos de los hongos, si tales propágulos existieren en el material.

Para observar si hubiera una eventual asociación entre *Fusarium* sp y el insecto más temprano que una sobre los brotes, se decidió, incluir yemas infestadas por larvas de polilla para ser tratadas según el método de cámara húmeda.

Resultados

Los resultados de inoculación se presentan juntos (Estudios 4.3.7.a.1 y 4.3.7.a.2), pues fueron considerados como tratamientos de un solo ensayo (Tabla 4.3.7.a-1).

Tabla 4.3.7.a-1. Resultados de inoculación de larvas de polilla del brote con *F.circinatum* y de larvas colocadas en brotes de pino inoculados con el patógeno.

Tratamiento	Brotos		% ataque
	Disponibles	Infectados	
Larva inoculada	109	65	59,6
Planta inoculada	59	46	77,9
Solo larvas sin inoc.	61	26	42,6
Solo <i>F.circinatum</i>	28	22	78,6

Aun cuando en el tratamiento solamente con larvas de polilla hay más de 40% de ápices con presencia de *F.circinatum*, el tratamiento con larvas inoculadas presenta sobre un 15% más de ataque, resultado que permite considerar que las larvas de polilla pueden acarrear el patógeno. Sin embargo, este hecho no tendría alta significancia pues la larva no tiene mayores posibilidades de ser infestada o de infectar otros árboles, pues su período expuesto es de corta duración. En el estudio no se demuestra que las larvas aumenten la infección de brotes con presencia de *F.circinatum* (77,9%) por sobre brotes inoculados solamente con el hongo (78,6%).

La asociación encontrada entre polilla del brote y cancro resinoso (Mathews, 1962, Runion, 1994) en la cual el hábito alimenticio de la polilla, heridas de penetración al brote, se asociaría a la entrada y colonización del patógeno al brote, se produce en ambientes donde *F.circinatum* está bien establecido en las plantaciones o bosques naturales de pino, situación que no ocurre en Chile y, aun, pudiera ocurrir que *F.circinatum* colonice tejidos ya moribundos por el ataque anterior de polilla y no sea la causa principal de muerte como lo sugiere Runion (1994), sino que solamente el brote le serviría como base alimenticia para multiplicarse.

c) Determinación de *F.circinatum* sobre brotes de pino muertos por polilla del brote.

Las determinaciones de *F.circinatum* en brotes de pino muertos por polilla del brote fueron negativas (Tabla 4.3.7.a-2).

Tabla 4.3.7.a-2. Cantidad de brotes que presentaron los distintos hongos encontrados sobre brotes de pino mantenidos en las cámaras húmedas.

Hongo	Predios			
	Tapihue (Brotos)	Parcela 10 (Brotos)	Peñuelas (Brotos)	Misque (Brotos)
<i>Fusarium</i> spp.	3	1	3	0
Basidiomicete	1	0	1	1
<i>Alternaria</i> sp.	1	1	0	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1	2	1	1
<i>Penicillium</i> sp.	1	2	4	3
<i>Trichoderma</i> sp.	2	3	3	1
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	2	1	0	2
<i>Gliocadium</i> sp.	0	0	0	1
Otras especies	5	7	2	8
Sin crecimiento fungos	0	0	0	0

Todos los brotes presentaron algún crecimiento fungoso, tanto en la cámara húmeda como en el medio de cultivo (Tablas 4.3.7.a-2 y 4.3.7.a-3). Los casos de muestras positivas a *Fusarium* spp. podrían tratarse de especies de *Fusarium* endófitos en pino, situación recientemente descrita para pino radiata en Chile (Pérez, 2003).

Tabla 4.3.7.a-3. Cantidad de brotes de pino que presentaron los distintos hongos en medio de cultivo selectivo (SNA).

Hongo	Predios			
	Tapihue (Brotos)	Parcela 10 (Brotos)	Peñuelas (Brotos)	Misque (Brotos)
<i>Fusarium</i> spp.	3	2	0	0
<i>Alternaria</i> sp.	1	2	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	0	1
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	1
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	2	1	0	2
Otras especies	3	4	7	3
Sin crecimiento fungoso	3	1	1	1

Las placas donde se probó placa dilución para determinar la presencia de propágulos en los tejidos de los brotes no presentaron crecimiento fungoso. La no determinación de *Fusarium* spp. por el método de dilución en el mismo material que se incluyó en cámara húmeda indica que las especies de este género presentes en los ápices de pino no se encontraban esporulando y produciendo unidades de propagación.

Los resultados muestran la presencia de *Fusarium* sp. en brotes de pino muertos por “polilla del brote” y tras pasados a cultivo o a cámara húmeda, pero las especies no correspondieron a *F.circinatum*.

Sorprende que se haya determinado presencia de especies de *Fusarium* en ápices muertos por polilla en tres de los cuatro predios muestreados cuando no hay referencias frecuentes a especies de este género sobre *Pinus radiata*. Es nuevamente posible que exista una especie de *Fusarium* que se comporte como endófito en pino radiata, situación que fue observada por Pérez (2003).

Tabla 4.3.7.a-4 Hongos asociados a brotes afectados por *R.buoliana*. Predio Huinganal (sobre 20 brotes).

HONGO	CÁMARA	NSM
<i>Fusarium</i> spp.	1	2
<i>Alternaria</i> sp	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1	0
<i>Penicillium</i> sp.	1	0
<i>Trichoderma</i> sp.	1	1
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	2	2
Otras	3	3
Sin hongos	0	1

La posibilidad que a largo plazo exista una eventual asociación entre daño de polilla y *F.circinatum* no puede descartarse de inmediato, pero exigirá la presencia del patógeno bien establecido en las plantaciones, y tampoco sería importante dada la escasa incidencia, pero podría contribuiría a mantener el patógeno en las plantaciones.

El muestreo y mantención en cámara húmeda de yemas afectadas por polilla del brote (20 yemas) no entregó resultados positivos a *F.circinatum*, no ocurre en las yemas.

Literatura consultada

- Anderson, R.L.1986. New method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Dwinell, L.D., Barrows-Broadus, J.B. y Kuhlman, E.G. 1985. Pitch canker: a disease complex. Plant Disease 69: 270-276.
- Kuhlman, E.G., Dianis, S.D. y Smith, T.K. 1982. Epidemiology of Pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard. Phytopathology 72: 1212-1216.
- Matthews, F.R. 1962. Pitch canker – tip moth damage association on slash pine seedlings. Journal of Forestry 60: 825-826.
- Pérez, N. 2003. Determinación de la calidad de endófito de *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr) Dyko y Sutton en *Pinus radiata* D.Don. Memoria de Título. Fac. Cs. Forestales. U de Concepción. Concepción, Chile. 33 pp.
- Runion, G.B., Cade, S.C. y Bruck, R.I. 1993. Effects of carbofuran and thiabendazole on incidence of pitch canker of loblolly pine. Plant Disease 77: 166-169.
- Sakamoto, J. Y Gordon, T.R. 2004. Colonization of Monterey pine (*Pinus radiata*) branches by twig beetles (*Pityosporus* spp) (Coleoptera: Scolytidae) in native stands affected by pitch

- canker in Pebble Beach, CA. Entomological Society of America. Annual Meeting, Nov. 16. 2004.
- Schmidt, R.A. y Underhill, E.M. 1974. Incidence and impact of pitch canker in slash pine plantations in Florida. *Plant Disease Reporter* 58: 451-454.
- Stegall, W.A. 1966. Fruiting of *Fusarium lateritium pini* on naturally infected pine pitch cankers. *Plant Disease Reporter* 50: 476-477.
- Storer, A.J., Wood, D.L. y Gordon, T.R. 2004. Twig beetles, *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) as vectors of the pitch canker pathogen in California. *The Canadian Entomologist* 136: 685-693.

4.32.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.32.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.7.b. Rol de los Escolitidos

4.3.7.b.1. Presencia de *F. circinatum* sobre escolitidos.

4.3.7.b.2. Inoculación de escolitidos con *F. circinatum*.

4.32.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

Algunos insectos propios de los pinos en el hemisferio norte han sido considerados vectores de *F.circinatum*. Blakeslee *et al.* (1981) indican a *Pissodes nemorensis* como vector, y Fox *et al.* (1991) a dos especies de *Ips*. Posteriormente, en California, los escolitos de ramillas, del género *Pityophthorus*, han sido demostrados como vectores del agente causal del cancro resinoso en pino radiata (Storer *et al.* 1999, 2004; Sakamoto *et al.* 2001).

Los escolitos asociados a pinos en Chile, *Hylaster ater*, *Hylurgus ligniperda* y *Ortothomicus* sp. podrían eventualmente ser vectores de *F. circinatum*, tal como lo son para *Ophiostoma* sp. y *Sphaeropsis sapinea*, (Miranda, 1993) además, han sido observados en plantas madres moribundas en un huerto donde hay plantas infestadas por *F.circinatum* (Vivero Carlos Douglas). La eficiencia de estos insectos como agentes de dispersión de la enfermedad “cancro resinoso” podría ser baja dada la menor actividad de los escolitos presentes en el país en plantaciones adecuadamente manejadas. Sin embargo, su acción ayudaría a mantener la enfermedad en las plantaciones.

Con el objetivo de conocer la capacidad de *H. ligniperda* y *H.ater* para transmitir *F.circinatum*, (estudio 4.3.7.b.2) se colectara insectos para ser inoculados y se evaluará su presencia sobre poblaciones (Estudio 4.3.7.b.1).

Material y método.

- a) Presencia de *F.circinatum* sobre escolitos.

El método originalmente propuesto consideraba obtener especímenes de *H. ater* e *H. ligniperda* desde plantas de pino infectadas por *F.circinatum*. Sin embargo, la baja incidencia de cancro resinoso en plantaciones y la nula presencia de escolitos en las plantas afectadas de cancro resinoso hizo impracticable obtener colecciones para el estudio. En vista de lo cual se consideró estudiar la presencia de *F. circinatum* u otras especies de *Fusarium* sobre poblaciones de escolitos presentes en tocones de la cosecha anterior en plantaciones recientemente establecidas. La colecta de insectos se realizó en tres oportunidades.

Los insectos colectados en el estudio pertenecieron siempre a la especie *H.ligniperda*, se mantuvieron en frío, por períodos variables, hasta su utilización. Para matarlos se colocaron en una atmósfera de NH₃ o se mataron en forma mecánica, luego se colocaron 5 o 10 insectos directamente en placas Petri con medio selectivo NSM.

b) Escolitos como vectores de *F.circinatum*.

Estudio originalmente planificado para realizarse en lugares abiertos, pero debido a las restricciones existentes respecto a *F.circinatum* debió ser realizado en cámaras herméticas preparadas ex profeso, capaces de contener bandejas con plantas de más de 1 m de altura. Dado que las cámaras no podían abrirse, la bandeja con plantas fue colocada sobre otra bandeja más amplia llena con agua.

Parte de los insectos colectados para el estudio, mantenidos en frío hasta horas antes de su traspaso a plantas de pino, fueron inoculados por aspersión de una suspensión de esporas ($1 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$) de *F.circinatum* (Tratamiento 1); otra parte de la población de escolitidos no fue inoculada pero se colocó sobre plantas inoculadas con pincel en la superficie de la parte inferior del tallo (Tratamiento 2) y un tercer lote sin inocular se colocó en plantas no inoculadas (Tratamiento 3).

El número de plantas por tratamiento fue diferente para cada caso. Al final del estudio, las plantas se cortaron y fueron trasladadas a laboratorio, donde se revisó si presentaban signos de colonización por escolitos. En todos los casos, se cortó astillas desde canchros o desde zona de daño de los insectos, que fueron sembradas en medio selectivo NSM para detectar la presencia de *F.circinatum*.

Resultados y Discusión

En los escolitidos analizados no se encontró presencia de *F.circinatum* (Tabla 4.3.7-1) probablemente porque los insectos no habían estado en contacto con plantas afectadas por el hongo.

Tabla 4.3.7-1. Determinación de presencia de *F.circinatum* sobre el escolitido *H.ligniperda*.

Colecta	Predio	N° escolitos	<i>Fusarium</i> spp.
Enero 2003	Brasil (Laja)	80	0
Abril 2004	El Carmen, Loma Colorada	306	1
Julio 2005	Loma Colorada Tres Marías	550	6
Total		936	7

Al inocular los insectos (tratamiento 1) o al inocular la superficie del tallo (tratamiento 2) se encontró que las plantas parasitadas por los escolitidos desarrollaban la enfermedad (Tabla 4.3.7-2).

Tabla 4.3.7-2. Presencia de *F.circinatum* en plantas con y sin daño por escolitidos.

Tratamiento	N° plantas	Aislamiento	Daño escolitidos		Total
			Con daño	Sin Daño	
1 Insecto Inoculado	28	<i>Sphaeropsis</i>	1	0	1
		<i>Fusarium</i> sp	5	2	7
		<i>F.circinatum</i>	7	5	12
		Otros	6	2	8
2 Tallo Inoculado	36	<i>Fusarium</i> sp	8	6	14
		<i>F.circinatum</i>	4	2	6
		Otros	8	8	18
3 Sin inoculación	18	<i>Fusarium</i> sp	5	10	15
		<i>F.circinatum</i>	0	0	0
		Otros	2	1	3
Total	82		46	36	82

La presencia de *F.circinatum* en las plantas sin daño de los insectos se puede explicar por la capacidad del hongo de penetrar por microheridas que pudieron ser causadas por los insectos al probar el material vegetal o por la remoción de acículas al instalar el ensayo.

Literatura consultada.

- Blakeslee, G.M., Foltz, J.L. y Oaks, S.W. 1981. The deodar weevil, a vector and wounding agent associated with pitch canker of slash pine. *Phytopathology* 71: 861.
- Fox, J.W., Wood, D.L., Koehler, C.S. y O'Keefe, S.T. 1991. Engraver beetles (Scolytidae: *Ips* species) as vectors as the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans*. *Can. Entomol.* 123: 1355-1367.
- Miranda, L.A. 1993. Determinación de la presencia de *Ceratocystis* sp. y *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr) Dykko y Sutton en los escarabajos de la corteza de *Pinus radiata*. Memoria de Título. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Concepción.

- Sakamoto, J.M., Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. Twig beetles, *Pityophthorus* spp., as vectors of the pitch canker pathogen (*Fusarium circinatum*) to Monterey pines (*Pinus radiata*) in California. Entomological Society of America. Annual Meeting.
- Storer, A., Wood, D. And Gordon, T. 1999. Insects vector of *Fusarium circinatum* in California, and their potential for the spread of pitch canker disease. Pp 45-48. In Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.
- Storer, A.J, Wood, D.L. and Gordon, T.R. 2004. Twig beetles, *Pityophthorus* spp., as vectors of the pitch canker pathogen in California. The Canadian Entomologist 136: 685-693.

4.33.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.33.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.8. Rol de las plantas de *P. radiata* sintomáticas en terreno

4.3.8.a. Plantación dirigida de *P. radiata*.

4.3.8.b. Prospección de *F. circinatum* en plantación normal

4.3.8.c Replantación en lugares donde existió una planta infestada con *F. circinatum*

4.33.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La probabilidad que plantas con infecciones producidas por *F.circinatum* en forma tardía en el vivero o con infecciones denominadas inactivas (Barrows-Broadus y Dwinell, 1983) o crípticas (Gordon *et al.*, 2001), sean despachadas a terreno donde terminarán mostrando los síntomas ha sido considerada por varios autores (Anderson, 1986; Blakeslee, 1999; Adams *et al.* 1999; Gordon *et al.*2001).

Para determinar la posibilidad de producción de inóculo o de contagio del suelo de plantas que mueren por *F.circinatum* en terreno se buscará plantar plantas con síntomas (Estudio 4.3.8.a) y observar el curso de la enfermedad, tomar muestras de suelo donde hubo plantas enfermas (Estudio 4.3.8.b) y reponer plantas sanas en el sitio donde hubo plantas muertas por el patógeno (Estudio 4.3.8.c).

Material y Método

a) Plantación dirigida de *Pinus radiata*.

En este estudio se consideraba que plantas con diferentes síntomas se seleccionarían para ser plantadas en macetas y observadas hasta la producción de esporodocios que confirmasen su rol como fuente de diseminación del patógeno.

b) Prospección de *F.circinatum* en plantación.

Plantas que mostraba síntomas en plantación (Nipilco suelo rojo arcilloso, Huinganal, suelo arenales) o en huerto de setos (Vivero Carlos Douglas, arenales) fueron extraídas, en diferentes oportunidades, marcando con una estaca el punto donde se encontraban. Las muestras fueron tomadas inicialmente donde había plantas con síntomas de clorosis y marchitamiento, pero posteriormente se tomaron de plantas ya muertas, considerando que la posibilidad de haberse formado esporodoquios en estas plantas debía ser mayor. Las plantas se llevaron al laboratorio para determinación de *F.circinatum*, si la determinación era positiva, se volvía al punto marcado y se tomaba muestras de suelo con un barreno de tarro en el punto donde se encontraba la planta enferma y a 30 y 60 cm. de distancia.

Las muestras de suelo fueron procesadas por el método de planta dilución (Johnson y Curl, 1972) y la dilución dispuesta sobre medio selectivo NSM.

c) Replante en puntos donde hubo plantas muertas.

Este estudio se realizó en el predio Huinganal (Forestal CELCO) en plantación 2003 que presentaba plantas con diagnóstico positivo a *F.circinatum* utilizando plantas provenientes del vivero PROPLANT libre del patógeno.

En el mismo punto ocupado por una planta enferma se replantó 119 plantas en Agosto 2004.

Resultados y Discusión

a) Plantación dirigida de *P.radiata*.

Este estudio se demostró rápidamente impracticable puesto que en pruebas preliminares, todas las plantas con síntomas de infección, desde clorosis a marchitamiento terminaban siempre muertas sin producción de esporodoquios (Informe Trimestral 3). Por otra parte, la disponibilidad de plantas con síntomas en los viveros fue siempre baja, dado el trabajo corriente de eliminación de material sintomático que se practica.

En otros estudios del proyecto, se logró obtener esporodoquios en plantas inoculadas artificialmente (Estudio 2.2.4; Estudio 4.4.1.), demostrando así la posibilidad de dispersar el inóculo desde plantas enfermas.

Por esta razón este estudio se consideró finalizado (Informe Semestral 3 y 5).

b) Prospección de *F.circinatum* en plantación.

Se completó 30 muestras de suelo para determinación de *F.circinatum*, en tres predios de la zona. (Tabla 4.3.8-1). Las muestras positivas provinieron de una misma plantación.

Tabla 4.3.8-1. Presencia de propágulos en muestra de suelo donde hubo una planta enferma.

Predio	Fecha	Total muestra	Positiva	Muestra 20 cm
Nipilco	Febrero 2004	3	0	0
Huinganal	Febrero 2004	3	0	0
Huinganal	Junio 2004	10	4	0
Carlos Douglas	Marzo 2005	9	0	0
Huinganal *	Octubre 2005	5	1	0

* Plantas muertas.

El hongo no se encontró a 20 cm. o mayor distancia desde el punto donde se encontraba el eje raíz principal de la planta afectada.

En ninguna de las plantas que se extrajo se observó esporodoquios, aun en aquellas donde se encontró presencia de *F.circinatum* en el suelo. Sin embargo, la presencia de propágulos en el suelo implica la formación anterior de esporodoquios. Es posible que el hongo los haya formado y las conidias haber escurrido al suelo y que luego los esporodoquios se hubiesen descompuesto bajo las condiciones ambientales existentes. No es probable que hubiera otras estructuras reproductivas en las raíces.

La ausencia de propágulos en el suelo en el vivero Carlos Douglas donde hubo plantas madres con síntomas y presencia de *F.circinatum* puede deberse a que las plantas fueron extraídas con síntomas de marchitez encontrándose el patógeno aun en la fase latente o antes de producir esporodoquios.

En todo caso, la posibilidad que el suelo sea infestado desde plantas enfermas existe aun cuando ocurra en baja proporción.

c) Replante en puntos donde hubo plantas muertas.

Las plantas de replante tuvieron muy buen prendimiento aun cuando se plantaron a salidas de invierno (agosto 2004). Entre las plantas recientemente plantadas se observó síntomas que no correspondían a los síntomas normales de *F.circinatum*, como ausencia de crecimiento, muerte de la yema terminal, enrojecimiento del extremo de las acículas, probablemente relacionados a sequía y deficiencias nutricionales.

Las plantas muertas en los muestreos no presentaron el patógeno en los primeros aislamientos (Tabla 4.3.8-2).

Tabla 4.3.8-2. Mortalidad asociada a *F.circinatum* en replante sobre puntos donde hubo plantas enfermas por el patógeno.

Fecha muestreo	Nº plantas	Patógenos
Enero 2005	19	No
Noviembre 2005	11	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium</i> sp.
Mayo 2006	6	<i>Sphaeropsis sapinea</i> (1), <i>Fusarium circinatum</i> (5)
Abril 2007	2	<i>Fusarium circinatum</i> (2)

La presencia de *F.circinatum* fue determinada en 7 plantas de replante cerca de dos años después del replante (Tabla 4.3.8-2). De este modo se comprueba la posibilidad que el hongo haga un ciclo desde vivero a plantación, permaneciendo en el suelo con capacidad de infestar plantas que se coloquen vecino al inóculo.

Literatura consultada.

- Adams, D.H., Franke, S.J. y Tidwell, T.E. 1999. Insects vector of *Fusarium circinatum* in California, and their potential for the spread of pitch canker disease. Pp 45-48. In Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.
- Anderson, R.L.1986. New method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*. Plant Disease 70: 452-453.
- Barrows-Broadus J., y Dwinell, L.D. 1983. Histopathology of *Fusarium moniliforme* var *subglutinans* in four species of southern pines. Phytopathology 73: 882-889.
- Blakeslee, G.M. 1999. Opinión, p.39 In: Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.
- Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85: 1128-1139.
- Johnson, L.F. y Curl, E.A.1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publ. Co., N.Y., 247 p.

4.34.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.34.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.9. Presencia de inóculo de *F. circinatum* en el ambiente

4.3.9.a. Determinación de esporas de *F. circinatum* en el aire

4.34.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La presencia de conidias en el aire ha sido evaluada por varios autores. Kuhlman *et al.* (1982) exponen placas Petri con medio selectivo durante 30 minutos, además de coleccionar en tronco agua de lluvia o lavar ramas muertas con agua esterilizada. Correl *et al.* (1991) exponen las placas con medio selectivo por periodos de 12 horas.

El monitoreo de presencia de inóculo es importante no solo para determinar la presencia del inóculo en un área dada sino porque también porque el procedimiento podría servir para establecer la oportunidad o eficacia de medidas de control.

En el presente estudio se informa de mediciones efectuadas en ambientes de viveros con presencia positiva de *F.circinatum*.

Material y método.

Placas de Petri con medio selectivo NSM, fueron expuestas durante 30 minutos sobre platabandas, entre las bandejas de los mesones y debajo de los mesones en viveros con producción de plantas a raíz cubierta: Viveros San Isidro, Bulnes, For. Millalemu; Vivero La Posada, Coronel, Bosques Arauco; Vivero María Las Cruces, Arauco, Bosques Arauco; Vivero Carlos Douglas, Yumbel, Forestal Mininco, Invernadero del Proyecto, Controladora de Plagas Forestales, Los Angeles. En el Centro de Biotecnología, Los Angeles, For. Mininco el tiempo de muestreo fue de 3 horas.

En algunos viveros, como San Isidro, Carlos Douglas, Invernadero, se tomó muestras en más de una oportunidad. El número de muestras por punto fue de 6 placas: 3 sobre el mesón y 3 bajo un mesón con bandejas, en cada oportunidad.

En el vivero con producción de plantas a raíz desnuda: Carlos Douglas, las placas se mantuvieron expuestas durante 5 horas.

Resultados

Tabla 4.3.9.a-1. UFC en las placas expuestas al aire, Vivero San Isidro (Enero 2004).

Lugar	Posición	UFC		
		<i>Fusarium spp.</i>	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Otros
Invernadero	Entre las plantas	0	5	5
	Bajo los mesones	0	11	7
Sombreadero	Entre las plantas	0	7	19
	Bajo los mesones	0	4	11

Tabla 4.3.9.a-2. UFC en las placas expuestas al aire, Vivero San Isidro (Marzo 2004).

Lugar	Posición	UFC		
		<i>Fusarium spp.</i>	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Otros
Invernadero	Entre las plantas	0	26	8
	Bajo los mesones	1	24	23
Sombreadero	Entre las plantas	0	10	0
	Bajo los mesones	1	0	16

Tabla 4.3.9.a-3. UFC en las placas expuestas al aire, Vivero Carlos Douglas (Enero 2004).

Lugar	Posición	UFC		
		<i>Sphaeropsis sapinea</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Otros
Sombreadero	Entre las plantas	39	2	20
	Bajo los mesones	5	0	4
Expuesta	Entre las plantas	22	0	35
	Bajo los mesones	13	0	65

Tabla 4.3.9.a-4. UFC en las placas expuestas al aire, Vivero Carlos Douglas (Marzo 2004).

Lugar *	Posición	UFC		
		<i>Sphaeropsis sapinea</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Otros
Sombreadero	Entre las plantas	33	7	10
	Bajo los mesones	40	10	5

* La lluvia impidió toma de muestras en exterior.

Tabla 4.3.9.a-5. Presencia de *F.circinatum* en el aire, viveros María Las Cruces y La Posada.

Vivero	Fecha	Muestra	Ubicación *	Aislamiento	Ufc
La Posada	09-08-2004	Aire	Abajo	<i>Fusarium spp.</i>	4
La Posada	09-08-2004	Aire	Abajo	Otro	3
La Posada	09-08-2004	Aire	Arriba	Otro	2
La Posada	09-08-2004	Aire	Arriba	<i>Botrytis</i>	5
La Posada	09-08-2004	Aire	Arriba	Otro	6
La Posada	09-08-2004	Aire	Arriba	Otro	4
La Posada	09-08-2004	Aire	Arriba	Otro	6
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Abajo	Otro	3
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Abajo	Otro	2
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Abajo	Otro	1
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Abajo	Otro	1
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Abajo	Otro	2
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Arriba	Otro	1
Las Cruces	01-08-2004	Aire	Arriba	Otro	2

* La ubicación se refiere a placas colocadas sobre o debajo de los mesones.

En el ambiente del invernadero CPF, donde se llevan estudios de inoculación al suelo y a la semilla, se determinó la presencia de *F.circinatum* en el aire, situación que parece lógica dado el uso de ese invernadero, las frecuentes inoculaciones de plantas y la alta cantidad de plantas enfermas en un reducido espacio. En los viveros San Isidro, segundo muestreo, Carlos Douglas, primer y segundo muestreo, La Posada, se determinó presencia de otras especies de *Fusarium* bajo los mesones o entre plantas, pero no *F.circinatum*, aun cuando en el vivero se observó plantas con síntomas y signos del patógeno.

Tabla 4.3.9.a-6. Resultado de muestreo del aire en invernaderos Centro de Producción de Plantas Bío Bío (3 horas).

Nave	Posición en mesón		<i>Fusarium</i>	
	Sobre	Bajo	<i>F.circinatum</i>	Otras especies
1	+	0	0	+
2	+	+	0	+
3	0	+	0	+
4	0	+	0	+
5	0	0	0	0
6	0	+	0	+
7	0	0	0	0
9	0	+	0	+
10	+	+	0	+
11	+	+	0	+
12	+	+	0	+
13	+	0	0	+
14	0	+	0	+
Somb	+	--	0	+

Además, se realizó muestreo de aire de 5 horas de duración en platabandas del vivero Carlos Douglas, en un sector (4) donde el Servicio Agrícola y Ganadero había determinado plantas afectadas por *F.circinatum*. En estos muestreos tampoco se determinó presencia del patógeno en el aire.

Es altamente probable que la carga de inóculo en los ambientes donde se efectuó la toma de muestras sea muy baja, producto de la rutinaria eliminación de plantas que muestran los síntomas y de tratarse de espacios semi-abiertos o abiertos, excepto el invernadero CPF. La detección positiva en este invernadero con exposición de 30 minutos sirve para valorar el método aplicado.

Literatura consultada

Kuhlman, E.G., Dianis, S.D. y Smith, T.K. 1982. Epidemiology of Pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard. *Phytopathology* 72: 1212-1216.

Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, W.J., Koehler, C.S., Wood, D.L. y Schlutz, M.E. 1991. Pitch canker Disease in California: Pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75: 676-682.

4.35.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.35.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.9. Presencia de inóculo de *F. circinatum* en el ambiente

4.3.9.a.1. Tiempo mínimo de muestreo del aire en espacios cerrados para determinar presencia de *F.circinatum*

4.35.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

Los tiempos de muestreo utilizados por diferentes autores fueron aplicados en plantaciones (Kuhlam *et al.* 1982; Correll *et al.* 1991). No hay información sobre toma de muestras de aire para determinar la presencia de *F.circinatum* en invernaderos o espacios relativamente confinados, como sombreaderos.

Utilizando el invernadero donde se lleva a cabo los estudios del proyecto (CPF, Los Angeles), donde hubo determinación positiva de *F.circinatum*, se determinará el tiempo mínimo que debe exponerse las placas para obtener información sobre la existencia de inóculo en el aire.

Material y método

Placas Petri con medio selectivo NSM para *Fusarium* se expusieron en el ambiente del vivero durante 5, 10, 20, 40 , 80 y 390 minutos, luego se incubarán a 22°C.

Resultados

Los resultados muestran que el tiempo mínimo de exposición de placas varía según la carga de inóculo en el ambiente, en la sala 1, al momento de exponer las placas bastó con 10 minutos de exposición para detectar *F.circinaum*, en cambio en la sala 2 fue necesario más de un hora de exposición para detectar *F.circinatum* (Tabla 4.3.9.a.1-1). Los resultados muestran que en ambientes cerrados no es posible establece un tiempo mínimo de exposición, ya que depende de la cantidad de inóculo en el ambiente.

Tabla 4.3.9.a.1-1. Colonias de *F. circinatum* en placas expuestas con medio selectivo.

Sala	Tiempo (minutos)	<i>F. circinatum</i> Colonias/disco Petri
1	5	0
1	10	3
1	20	6
1	40	8
1	80	11
1	390	+*
2	5	0
2	10	0
2	20	0
2	40	0
2	80	0
2	390	+*

* Positivas a *F. circinatum*, pero no se pudo contar la cantidad de colonias

Literatura consultada

- Kuhlman, E.G., Dianis, S.D. y Smith, T.K. 1982. Epidemiology of Pitch canker disease in a loblolly pine seed orchard. *Phytopathology* 72:1212-1216
- Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, W.J., Koehler, C.S., Wood, D.L. y Schlutz, M.E. 1991. Pitch canker Disease in California: Pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75:676-682.

4.36.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.36.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.9. Presencia de inóculo de *F. circinatum* en el ambiente

4.3.9.a.2. Determinación de inóculo en ambientes abiertos, plantaciones o vivero usando trampa de esporas y PCR.

4.36.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Los autores Schweigkoffler *et al.* (2004) informan de una técnica que permite detectar propágulos de *F.circinatum* usando discos de Petri con medio de cultivo selectivo cubierto con papel filtro adicionado con un buffer como trampa de esporas, que le permite mantenerlas por días en exposición. Las determinaciones de *F.circinatum* se hacen en PCR tiempo real.

El método puede dividirse en dos etapas: probar el sistema de trampas de esporas, que permitiría capturar esporas por tiempos mas prolongados que el tiempo real y aislar desde ellas para identificar por métodos convencionales o PCR.

Método

Placas Petri preparadas según Schweigkoffler *et al.* (2004) fueron expuestas en invernadero CPF y evaluadas según la metodología del autor, con la diferencia que las placas se expusieron por 6,5 hrs., se empleó el protocolo de PCR normal empleado por el SAG y una parte de los papeles filtro fueron agitados en 250 mL de ADE y alícuotas de 0,5 mL sembradas en medio selectivo para *Fusarium*.

En cada sala del invernadero se expusieron 10 placas, después del periodo correspondiente fueron transportadas a laboratorio donde se realizaron los análisis correspondientes. Para realizar los aislamientos y agitación se empleó la mitad de las placas de cada sala, la otra mitad se empleó para protocolo PCR. El lavado de los papeles filtro con Buffer TE fue mezclado para realizar una sola muestra que fue almacenada en frío (4°C) hasta su análisis en PCR.

Resultados

La exposición de las placas con el papel filtro permite extender el periodo de muestreo, sin embargo, por lo reducido del tiempo empleado en el estudio no se tuvo el problema de que se secase el medio en placas sin papel filtro.

Desde las placas expuestas con papel filtro se logró aislar *F. circinatum*, desde trozos de papel, sin embargo, al agitar el papel con agua destilada estéril no se logró aislar el hongo (Tabla 4.3.9.a.2-1). Al realizar el lavado del papel filtro con Buffer TE y aplicar protocolo PCR empleado por SAG, se logró identificar *F. circinatum* (Figura 4.3.9.a.2-1, banda 13), a pesar que en la prueba, el aislamiento empleado como negativo fue positivo a *F.circinatum*, probablemente por contaminación del cultivo.

Tabla 4.3.9.a.2-1. Detección de *F.circinatum* en placas expuestas con papel filtro durante 6,5 hrs.

Tratamiento	Presencia de <i>F. circinatum</i>	
	Sala 1 invernadero	Sala 2 invernadero
Papel filtro agitado en ADE	0 ufc	0 ufc
Papel filtro cultivado en NSM	1,2 ufc/cm ²	0,6 ufc/cm ²
Papel filtro lavado con bufferTE y protocolo PCR	Detección positiva	

Los resultados indican que el empleo de papel filtro y posterior cultivo o aplicación de PCR con primers específicos para *F.circinatum* permiten detectar la presencia del inóculo en el ambiente,

pero solamente el cultivo permite cuantificar la cantidad de inóculo, ya que para poder realizar la cuantificación propuesta por Schweigkoffler *et al.* (2004) es necesario realizar PCR en tiempo real.

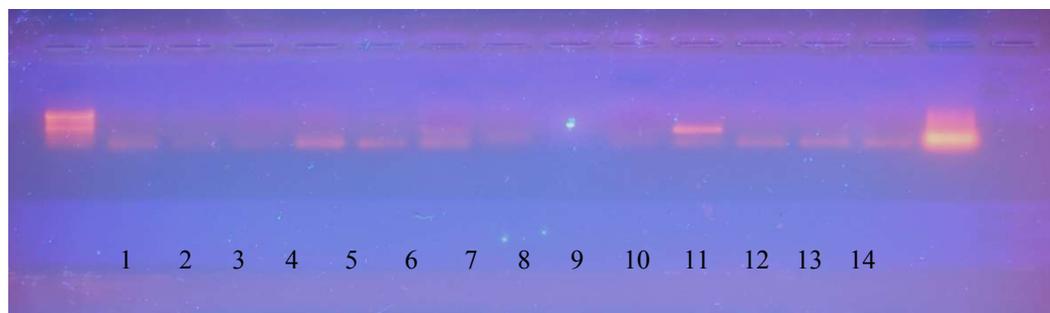


Figura 4.3.9.a.2-1. Resultados protocolo PCR aplicados a diferentes muestras de hongos, banda 13 corresponde a lavado de esporas con Buffer TE desde papel filtro.

Literatura consultada

Schweigkoffler, W., O'Donnell, K y Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using real time PCR approach combined with simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3512-3520.

4.37.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.37.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.9.b. Determinación de esporas de *F. circinatum* en agua de riego escurrida

4.37.2.AVANCE REAL

Introducción

La presencia de *F.circinatum* en el agua de riego ha sido mencionada por Wingfield (1999) y no aparece otras referencias en la literatura consultada, probablemente por tratarse el “cancro resinoso” de un problema en plantaciones. Muchos hongos pueden ser distribuidos por el agua de riego, especialmente cuando esta proviene de sistemas de canales que pasan por diferentes predios y donde en los bordes de los canales es común la presencia de malezas. En los sistemas de riego de pozo profundo normalmente no hay patógenos, pero si se usa estanques o piletas abiertas de

acumulación, es posible que propágulos en el aire sean depositados en el agua que se usará en el riego de las plantas.

Con el objetivo de determinar la presencia actual de conidias de *F.circinatum* en los viveros que han tenido detección positiva del patógeno, se muestreo el agua de riego de los mismos.

Material y Método.

Muestras de agua fueron tomadas en los viveros San Isidro, Carlos Douglas, La Posada y Maria Las Cruces. Las muestras, sobre 5 mL, se colectaron en vasos de vidrio esterilizados en 3 puntos del sistema de riego: a). desde la salida de los aspersores, b). desde las plantas recién regadas y c). desde los orificios de salida de las cavidades de las almacigueras o tubetes. Para cada situación se tomaron 4 muestras.

Los frascos con las muestras de agua obtenida en terreno se colocaron en cajas enfriadoras para ser transportados a laboratorio.

En laboratorio alícuotas de 0,5 mL tomadas de cada fue frasco fueron colocadas en cada disco de Petri con medio selectivo NSM: y luego incubadas a 22° C. Dado el elevado número de colonias bacterianas desarrolladas, para el segundo muestreo en el vivero Carlos Douglas se realizó diluciones 1:10 y 1:100 del agua colectada desde las bandejas para minimizar la contaminación observada.

Resultados y Discusión.

En el agua de riego muestreada en los viveros no se observa la presencia de *F.circinatum* (Tabla 4.3.9.b-1). Sin embargo, es muy frecuente la determinación de otras especies de Fusaria en el agua tanto sobre las plantas como en agua que escurre desde los contenedores. Teóricamente entonces, si existiese *F.circinatum* en el ambiente de un invernadero, el curso del inóculo sería: desde la planta infestada al aire, luego el riego hace bajar el inóculo depositándolo sobre otras las plantas o sobre el sustrato o sobre el suelo. Los primeros síntomas que se esperaría en plantines en su primera etapa de desarrollo sería la ocurrencia de la enfermedad como infecciones en el nudo cotiledonario. Situación que debe haber ocurrido en el invernadero de la Controladora de Plagas Forestales, donde se realizaron los ensayos, y hubo muy alta incidencia de ataques aéreos a las plantitas en desarrollo.

Tabla 4.3.9.b-1. UFC en muestras de agua de riego de diferentes viveros de pino.

VIVERO	FECHA	UBICACIÓN	AISLAMIENTO	UFC	
San Isidro	08.01.2004	Directo	Otros	5	
			Follaje	Otros	4
			Escurrida	<i>Fusarium</i> sp.	10
San Isidro	05.03.2004	Directo	Otros	1	
			Follaje	<i>Sphaeropsis</i> sp	4
				Otros	5
			Escurrida	<i>Fusarium</i> sp	Presente *
C. Douglas	14.01.2004	Directo	No	no	
			Follaje	<i>Sphaeropsis</i> sp	55
				Otros	35
			Escurrida	<i>Fusarium</i> sp	Presente
C. Douglas	05.03.2004	Directo	<i>Sphaeropsis</i> sp	1	
			Follaje	<i>Fusarium</i> sp	1
				<i>Sphaeropsis</i> sp	48
				Otros	11
			Escurrida	<i>Sphaeropsis</i> sp	85
				Otros	17
Las Cruces	01.08.2004	Directo	No	no	
			Follaje	<i>Fusarium</i> sp	130
			Escurrida	Otro	117
				<i>Fusarium</i> sp	112
La Posada	09.08.2004	Directo	No	no	
			Follaje	Otro	5
			Escurrido	<i>Fusarium</i> sp	120
			Follaje	<i>Fusarium</i> sp	120
			Escurrido	<i>Fusarium</i> sp	30
			Follaje	<i>Fusarium</i> sp	4
			Escurrido	<i>Fusarium</i> sp	30

* Presente: se observa colonias de *Fusarium* spp pero no se logra contabilizarlas por la gran abundancia de colonias bacterianas.

En estudios paralelos al proyecto, sin embargo, se determinó presencia de *F.circinatum* en muestras del agua de riego (Miguel Castillo, Gloria Molina, Com. Personal)¹ que se recicla para producción de plantas en hidroponía en el Centro de Biotecnología (Forestal Mininco, Los Ángeles). En este caso, el agua que se mantiene o circula por las cajas en las cuales están semi-sumergidas las bandejas es colectada y almacenada para nuevos riegos, de este modo, si *F.circinatum* alcanza el agua puede mantenerse en ella e inocular nuevas plantas.

Este resultado comprueba la presencia de *F.circinatum* en agua.

¹ M.Castillo, Mg.Sc. Jefe Dpto. For. Mininco; G. Molina, Mg.Sc. Jefe Laboratorio, Biocaf Ltda.

Literatura consultada

Wingfield, M.J.1999. Opinion, p.68. In. Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and Potential Impact of Pitch Canker in Radiata Pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop. Monterey, CA. 30 Nov. To 3 Dec.

4.38.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.38.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.10. Determinación de ocurrencia de cancro resinoso en estacas de *P. radiata* a raíz desnuda

4.38.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

La primeras detecciones de *F.circinatum* en Chile fueron sobre plantas mantenidas en bolsa, provenientes de propagación vegetativa, y plantas madre en terreno (Wingfield *et al.* 2002), luego en plantas de vivero, tanto de semilla como plantas de estacas tomadas de huertos de setos. La presencia de *F.circinatum* no fue inicialmente determinada sobre estacas obtenidas de plantas de pinos establecidas en terreno (field cuttings), las que se estaban en platabandas a raíz desnuda. El estudio de tipo observacional tiene como objetivo examinar si la producción de plantas vía estacas de terreno es menos vulnerable a infecciones de *F.circinatum*

Método

Estudio observacional y de seguimiento de platabandas con “field cuttings” en el vivero Carlos Douglas e información de otros viveros que usan este sistema de producción.

Resultados

En las temporadas 2004-05 no se observó mortalidad asociada a *F.circinatum* en el área de producción de estacas del vivero Carlos Douglas, pero si había ocurrido en los viveros Quivolgo y La Posada. (Tabla 4.3.10-1).

Tabla 4.3.10-1. Ocurrencia de *F.circinatum* en estacas a raíz desnuda en los viveros que se indica. (Fuente: Mesa Redonda “Fusarium circinatum en Viveros en Chile”, CPF, SAG, U de C. Los Ángeles, 6 Septiembre 2005).

Vivero	Temporada			
	2002	2003	2004	2005
Quivolgo	1,5	0,8	5,7	1,9
La Posada	0	0,3	0,14	0,10

En la temporada 2005, en muestras asintomáticas tomadas por inspectores del Servicio Agrícola y Ganadero en el vivero Carlos Douglas, se detecta presencia de *F.circinatum*, pero en el vivero no se observa plantas con síntomas ni ocurre mortalidad atribuible al patógeno.

Los datos proporcionados por el vivero Quivolgo satisfacen los objetivos del estudio ya que la incidencia de mortalidad en estacas producidas a raíz desnuda y atribuible a *F.circinatum* en ese vivero ha alcanzado niveles sobre 5% de mortalidad.

4.39.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.39.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.10.a. Ocurrencia de infección en estacas de *P. radiata* a raíz desnuda

4.39.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

La presencia de infecciones asociadas a *F.circinatum* en plantas formadas desde estacas (cuttings) establecidas a raíz desnuda en viveros es un hecho cierto. Las infecciones se originan en el suelo y no corresponden a infecciones aéreas, pero no se conoce si la infección se inicia durante el largo período invernal donde permanecen sin crecimiento hasta formar el callo basal o si se inicia cuando ha comenzado el crecimiento de raíces en primavera. En los sistemas de producción de plantas desde estacas a raíz cubierta, la enfermedad siempre ocurre en plantas ya desarrolladas.

Con el objetivo de conocer sobre el proceso infeccioso de *F.circinatum* en estacas se realizó un estudio bajo condiciones de invernadero

Material y método

Estacas gruesas provenientes de plantas madre del vivero Carlos Douglas fueron colocadas a enraizar en substrato y suelo inoculado y sin inocular, en el invernadero CPF, Los Ángeles. Para ello se empleó una bandeja del estudio de control biológico donde ocurrió 100 % de mortalidad por *F.circinatum*. En esta bandeja se instalaron 88 estacas recién cortadas, además se instalaron estacas en maceteros con arena (cinco maceteros con suelo inoculados con *F.circinatum* y cinco maceteros con suelo sin inoculación), en cada macetero se colocaron 4 estacas. Después de 3

meses se evaluó el ensayo, en el caso de los maseteros se llevaron todas las estacas a laboratorio para su cultivo en medio selectivo y PDA, en el ensayo a raíz cubierta se tomó una muestra de 40 estacas, que también fueron sometidas a aislamiento en medio selectivo NSM y PDA.

Resultados

En observaciones realizadas durante el desarrollo del ensayo se determinó, en algunas estacas, necrosis en la parte inferior de esta, pero en su sección superior permanecía verde, al sacar estas estacas la parte enterrada estaba podrida, esta situación se reiteró al levantar el ensayo.

De todas las estacas evaluadas sólo 2 formaron callo (en el tratamiento correspondiente a suelo sin inoculación de *F. circinatum*), el resto presentaban pudrición en la zona enterrada de la estaca. Tanto desde estacas en sustrato como suelo inoculado, se obtuvo el patógeno, además, de otros hongos como *Trichoderma*, *Diplodia* y *Botrytis*.

Tabla 4.3.10.a-1. Hongos aislados desde estacas a raíz desnuda y cubierta.

Tratamiento	Hongos aislados desde las estacas evaluadas (%)			
	<i>F. circinatum</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Diplodia pinea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Raíz cubierta	85	60	17,5	12,5
Suelo Inoculado	80	0	0	0
Suelo sin inoculación	0	0	0	5

Los resultados indican que *F.circinatum* puede afectar estacas pasando desde el suelo o sustrato a los tejidos de la esta.

4.40.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.40.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.11. Revisión de plantaciones de *P. radiata* vecinas a puntos con infestación conocida de *F.circinatum*.

4.40.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La posibilidad que el inóculo de *F. circinatum* se disperse desde los viveros infestados y alcance plantaciones, bosquetes o cortinas vecinas al vivero, se examina en este proyecto utilizando observaciones de plantas y toma de muestras de corteza de plantas sospechosas.

Por otra parte, la situación actual de la enfermedad, presente en 3 viveros de la Región del Maule (Quivolgo, Villa Alegre y El Álamo) y 5 viveros en la Región del Bío Bío, (La Posada, Las Cruces, San Isidro, Carlos Douglas, Membrillar), ha llevado a que un elevado número de predios (plantaciones) tengan determinación positiva de *F. circinatum*, por haberse plantado con plantas que salieron asintomáticas desde esos viveros, pero que manifestaron posteriormente la enfermedad. Esta situación hace necesario que se diseñe un sistema de observación de plantaciones de más edad vecinas a los sitios recientemente plantados donde ocurra mortalidad atribuible a *F.circinatum*, dado que el riesgo de dispersión es mayor en las plantaciones por el período más largo de tiempo que permanece en terreno una planta infectada ya que en plantaciones la eliminación de plantas enfermas, como opera en los viveros, no es practicada.

Método

Se mantiene como puntos de observación plantaciones contiguas a vivero Carlos Douglas (Tres Marías y El Carmen), vivero La Posada (cortinas) y en plantación mayores de 6 años en predio Huinganal y de 4 y 5 años en Santa María de Mingre.

Resultados y Discusión.

Los recorridos en los predios Tres Marías y El Carmen, así como las observaciones (con binoculares) de las cortinas de pino en La Posada, y las observaciones en Santa María de Mingre y Huinganal han resultado permanentemente negativos.

En Huinganal, en plantación mayor de 5 años, vecina a plantación 2004 con plantas afectadas por *F.circinatum*, se encontró dos plantas con clorosis, una con canchales y la otra sin otros síntomas, muestras de ambas plantas fueron negativas a la presencia de *F.circinatum*.

Los resultados negativos a la presencia de plantas con cancro resinoso en las plantaciones no necesariamente significan que el hongo esté ausente en ellas. Puede ocurrir que exista inóculo pero en cantidades insuficientes aún para originar enfermedad en plantas adultas.

Recientemente se ha informado que *F.circinatum* fue determinado sobre plantaciones de *Pinus radiata* de 5 y 9 años en Sudáfrica, dejando de ser un patógeno exclusivamente circunscrito a viveros (Coutinho *et al.* 2007). El hongo fue determinado en viveros de *Pinus patula* en Sudáfrica en 1990-91 y le tomó más de quince años en irrumpir en plantaciones de *P.radiata* ubicadas bastante al sur de la zona de cultivo de *P.patula*. La presencia del gorgojo del pino, *Pissodes nemorensis*, con detección positiva de *F.circinatum*, en las plantaciones afectas en Sudáfrica puede asociarse a la irrupción informada. Si esta relación insecto – enfermedad fuera la causa del paso de vivero a plantaciones, entonces en Chile debe esperarse que la ocurrencia en plantaciones no ocurra o, que le tome, más tiempo que quince años.

En todo caso, si se conserva la situación actual, donde no es posible limitar la distribución de plantas con infección latente a plantaciones, y donde no se elimina las plantas muertas en los primeros años por *F.circinatum*, es solo cuestión de tiempo el paso de la enfermedad a las plantaciones.

Literatura consultada

Coutinho, T.A., Steenkamp, E.T., Mongwaketsi, K., Wilmot, M. y Wingfield, M.J. 2007. First outbreak of pitch canker in a South african pine plantation. *Australasian Plant Pathology* 36: 256-261.

4.41.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.41.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.12. Efecto de la poda de raíces en la infestación de *F. circinatum*.

4.41.2.AVANCE A LA FECHA

La poda de raíces es una práctica habitual en los viveros que producen plantas de semilla a raíz desnuda. Normalmente, se realiza en verano y podría asociarse a infecciones por *F.circinatum* que hacen su mayor incidencia después de la poda, estas infecciones se iniciarían por las heridas de poda y se producirían siempre y cuando en el suelo exista una carga de inoculo suficiente.

Básicamente, entonces, el problema no es la poda de raíces sino la carga de inoculo en el suelo, situación que puede cuantificarse fácilmente. Toda vez que la poda de raíces se considera una labor indispensable y no descartable en el vivero.

Dada estas razones no se incluyó un tratamiento específico con poda de raíces en el estudio 2.2.2.c que era de donde se obtendrían los datos para esta evaluación.

4.42.NOMBRE DE LA META.

META 4

4.3. Epidemiología de *F. circinatum*

4.42.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

4.3.13. Comportamiento de *Fusarium circinatum* sobre madera.

4.42.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Fusarium circinatum actualmente se distribuye en América del Norte (USA y México), América Central (Haití), América del Sur (Chile), Oceanía (Japón), África (Sudáfrica) y Europa (España). Los países libres de *F.circinatum* se han precavido de su introducción normando la importación de material que pueda albergarlo. Pero también, en países donde el hongo está asentado, se toman medidas para evitar que ingrese a áreas no colonizadas, como USA a Sierra Nevada o al Noroeste, o que ingresen “razas” potencialmente más virulentas que las existentes en un país, como sería la posición de México.

Ha sido establecido que *F.circinatum* sobrevive sobre ramas muertas (Blakeslee *et al.*1980) y sobre astillas (Gordon 2001), de este conocimiento se ha derivado medidas que regulan ingreso de madera de países o regiones positivas a la presencia del patógeno a otras áreas libres.

En el presente trabajo se investiga la capacidad de *F.circinatum* para colonizar madera fresca y producir nuevos propágulos, y la supervivencia de conidias sobre corteza.

Ensayos

a). Supervivencia de conidias expuestas a la luz solar.

Material y método

Se asperjó una suspensión de esporas de *F.circinatum* de concentración $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ sobre 20 placas de papel filtro esterilizado. El papel se secó a 25°C y se colocó en placas Petri cubiertas con parafilm. La mitad de las placas quedó expuesta a la luz solar directa tras una ventana del laboratorio y la mitad en obscuridad. El crecimiento de *F. circinatum* fue evaluado semanalmente. A los 60 días se sacó el papel inoculado y 10 segmentos de 25 mm^2 de cada placa se sembró en medio NSM.

Resultados

El hongo *F.circintum* puede crecer sobre papel filtro expuesto a la luz diurna. (Figuras 4.3.13-1 y 4.3.13-2).



Figura 4.3.13-1. Papel filtro inoculado, se observa crecimiento puntual del hongo.

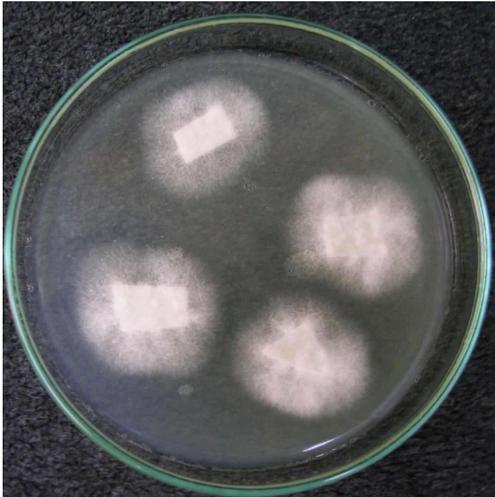


Figura 4.3.13-2. Crecimiento de *F.circinatum* desde papel inoculado.

b). Inoculación de madera: sobre área de corte.

Material y método

Un árbol de más de 8 años pero que crecía a muy alta densidad (0,5 m) y presentaba diámetro de 12 cm, fue volteado se cortaron pequeñas rodelas que se colocaron en bolsa plástica para su traslado a laboratorio donde fueron asperjadas con suspensión de esporas de *F.circinatum* ($1 \cdot 10^5$ mL⁻¹). Las rodelas asperjadas se colocaron en bolsa; 5 se mantuvieron en obscuridad dentro de una caja de cartón, e igual número de bolsas se mantuvo en condiciones de laboratorio.

Resultados

Los resultados a 90 días de las inoculaciones realizadas sobre pequeñas rodelas de pino indican que *F.circinatum* puede crecer sobre la madera. (Figura 4.3.13-3 y 4.3.13-4).



Figura 4.3.13-3. Rodela inoculada con *F.circinatum* y mantenida en oscuridad.



Figura 4.3.13-4. Rodela inoculada con *F.circinatum* y mantenida a la luz diurna.

c). Colonización de piezas de madera.

Material y método

Se cortaron 5 secciones del fuste de un árbol recién volteado de 30 cm. Las trozas fueron asperjadas con suspensión de esporas correspondientes a mezcla 4641 con 6522 ($1 \cdot 10^4$ esporas/mL), en ambas caras, y cubierta con bolsa plástica esterilizada. Las trozas se dejaron en incubación en laboratorio, después de 2 meses se extrajeron astillas de madera (20 astillas/troza) desde las caras inoculadas, los que fueron desinfectados con hipoclorito (1%) y sembrados en medio selectivo para *Fusarium*.

Resultados

Desde las 5 trozas se obtuvieron 3 con presencia de *F. circinatum*, en las caras inoculadas, pero no se logró aislar en la parte central de la troza (Tabla 4.3.13-1).

Tabla 4.3.13-1. Presencia de *F. circinatum* en inoculaciones en madera recién cortada.

Troza	Astillas con <i>F.circinatum</i> (%)	
	En el corte	En la parte central de la troza
1	10	0
2	0	0
3	20	0
4	10	0
5	0	0

F.circinatum puede crecer sobre área de corte dentro de la madera, pero su crecimiento es restringido internamente.

d). Inoculación de madera: vertical en suelo infestado.

Material y método

Cinco trozas frescas de 20 cm fueron enterradas en forma vertical en cajas con suelo inoculado con harina colonizada por *F.circinatum*, y suspensión de esporas. Luego de 2 meses se realizaron aislamientos desde la zona enterrada en medio selectivo para *Fusarium*.

Resultados

Al término del ensayo se observó que en 4 de las 5 trozas enterradas se aisló *F. circinatum* desde la madera (Tabla 4.3.13-2), lo que indica que el hongo es capaz de colonizar madera recién cortada.

Tabla 4.3.13-2 Porcentaje de aislamientos correspondientes a *F. circinatum* en las trozas enterradas.

Troza	Astillas con <i>F.circinatum</i> (%)
1	20
2	0
3	20
4	40
5	25

e). Inoculación de madera: horizontal en suelo infestado.

Material y método

Doce trozas frescas de 20 cm fueron semi enterradas en cajas con suelo inoculado con harina colonizada por *F.circinatum*, y suspensión de esporas. Después de 2 meses se realizaron aislamientos (20 astillas/troza) desde la zona enterrada en medio selectivo para *Fusarium*.

Resultados

Desde los aislamientos se obtuvo que diez de las doce trozas fueron positivas a *F. circinatum* (Tabla 4.3.13-3), lo que indica que el hongo puede colonizar la corteza y madera de madera recién cortada.

Tabla 4.3.13-3. Porcentaje de aislamientos correspondientes a *F.circinatum* en las trozas enterradas.

Troza	Astillas con <i>F.circinatum</i> (%)	Troza	Astillas con <i>F.circinatum</i> (%)
1	15	7	0
2	20	8	45
3	20	9	25
4	40	10	30
5	15	11	20
6	15	12	0

f). Colonización de piezas de madera.

Material y método

Piezas de madera seca fueron sometidas a distintos tratamientos para la inoculación con esporas de *F. circinatum* (1×10^4 esporas/mL); Doce piezas fueron inoculadas con suspensión de esporas en glucosa (2 %) y las otras doce con ADE. Luego se colocaron en bolsa plástica esterilizada durante 90 días. Antes de realizar la inoculación la mitad de las piezas fueron desinfectadas con hipoclorito (1%) y la otra no fue desinfectada (Tabla 4.3.13-4). Para cada tratamiento se emplearon 4 repeticiones. Al término del estudio se realizaron aislamientos en medio selectivo para *Fusarium* desde todas las piezas de madera.

Tabla 4.3.13-4. Tratamientos empleados en inoculación de piezas de madera.

Tratamiento	Descripción
T0	Madera sin desinfección, inóculo en ADE
T1	Madera sin desinfección, inóculo con glucosa (2%)
T2	Madera desinfectada, inóculo en ADE
T3	Madera desinfectada, inóculo con glucosa (2%)

Resultados

A pesar que inicialmente se observó crecimiento de micelio en la superficie de las piezas de madera, especialmente en las tratadas con glucosa, al término del estudio no se logró reaislar desde ningún tratamiento a *F. circinatum*, en algunas piezas sin desinfección se observó crecimiento de *Trichoderma* sp. (Tabla 4.3.13-5).

En las condiciones del estudio, *F. circinatum* no fue capaz de colonizar madera seca

Tabla 4.3.13-5. Presencia de *F. circinatum* en piezas de madera.

Tratamiento	Presencia de <i>F.circinatum</i>	Presencia de <i>Trichoderma</i>
T0	-	+
T1	-	+
T2	-	-
T3	-	-

Literatura consultada

Blakeslee, G.M., Dwinell, L.D. y Anderson, R.L. 1980. Pitch canker of southern pines. Identification and Management Considerations. USDA. FS. Forest Health Protection, Southern Region. Bull. SA-FR-11.

Gordon, T.R., Storer, A.J. y Wood, D.L. 2001. The pitch canker epidemic in California. Plant Disease 85: 1128-1139.

4.43.NOMBRE DE LA META.

META 5

5.1. Control químico

4.43.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.1.1. Selección de productos para el control de *F. circinatum in vitro*.

5.1.2. Control con fungicidas de damping off provocado por *F. circinatum*.

5.1.3. Fungicidas en suelo para control de infecciones tardías de *F.circinatum*.

4.43.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La posibilidad de aplicar control químico para disminuir la incidencia de cancro resinoso en plantaciones no ha sido evaluada directamente. Runion *et al.* (1993) probaron aplicaciones conjuntas de insecticida (carbofurano) y fungicida (thiabendazole) en el control de *F.circinatum*, considerando un efecto sobre polilla del brote como agente cuyo daño facilita la invasión por el hongo, logrando menor porcentaje de infección y mayor altura en las plantas de un año en plantación con aplicaciones repetidas cada cuatro semanas durante ocho meses con thiabendazole. La eficacia *in vitro* contra *F.circinatum*, así como el efecto de control sobre plantas de *Pinus taeda* de tres meses, inoculadas con el patógeno, fue probada por Runion y Bruck (1988) logrando adecuada reducción en la incidencia de enfermedad pero con efecto temporal. Las dosis probadas, sobre 14 gr L⁻¹ de ingrediente activo hacen poco practicable el uso de fungicida en el control de cancro resinoso. Mitchell *et al.* (2004) probaron benomil aplicado en el momento de la plantación,

logrando mejorar la supervivencia de las plantas tratadas hasta más de 180 días pero el efecto no perduró a 360 días.

El control químico de *F.circinatum in vitro* ha sido recientemente estudiado por Mitchell *et al.* (2005) obteniendo adecuado control con prochloraz manganeso, tebuconazole y propiconazole. Los productos no han sido probados *in vivo*, pero hay efecto fitotóxico sobre *Pinus patula* de 8 meses (Allen *et al.* 2000).

Se informa en este trabajo de resultados de pruebas de productos *in vitro* sobre el crecimiento de colonias de *F.circinatum* en medio de cultivo y aplicaciones al suelo en invernadero para control de ataques tempranos del patógeno.

Material y método

a) Pruebas *in vitro*.

Originalmente se había planificado un estudio de pruebas de productos en proceso de registro que las compañías fabricantes de fungicidas pudiesen ofrecer para el control de *Fusarium*. Ante la nula oferta de este tipo de productos, se decidió probar productos comerciales con algún uso en el control de alguna especie de *Fusarium*. Difenconazole ha sido usado en control de fusariosis en trigo y fludioxonil, en papas.

La capacidad de difenconazole y fludioxonil para inhibir el crecimiento de *Fusarium circinatum* en PDA fue evaluada en concentraciones de 1 ppm, 10 ppm, 50 ppm y 100 ppm. Los productos se aplicaron al medio (PDA) al momento de la esterilización.

Posteriormente, se probó, por el mismo procedimiento, la capacidad de inhibición del crecimiento de los fungicidas tebuconazole y captan.

El efecto sobre el crecimiento del patógeno se evaluó midiendo el crecimiento radial de la colonia de *F. circinatum* en el medio de cultivo.

b). Pruebas en suelo en invernadero.

El suelo de textura arenosa (Vivero Carlos Douglas) fue esterilizado en autoclave (121°C 20 min) en dos días consecutivos y luego pesado y mezclado con los fungicidas tebuconazole (Tacora™ 25 WP) y difenconazole (Dividend™ 030 FS), y luego colocado en bandejas de papel grueso de aluminio de 30x24x6 cm. Dispuestas sobre un mesón del invernadero Posteriormente el suelo fue regado previo a la inoculación con 5 mL de aspersión de esporas de *F.circinatum* en concentración de 1×10^6 por bandeja. El ensayo fue sembrado una semana después de inoculado. Con dos hileras de siembra de 10 semillas cada una por bandeja. El ensayo fue evaluado por recuentos de emergencia y muerte de plantas.

c). Fungicidas de suelo para control de infecciones tardías de *F.circinatum*

En este estudio se pretendía probar fungicidas sobre plantas inoculadas en estados más avanzados de desarrollo, sin embargo, la evidencia obtenida en cuanto a que es muy frecuente la ocurrencia de plantas con infecciones latentes (Barrows-Broadus y Dwinell, 1983) o crípticas (Gordon *et al.* 2001), lo que resta confianza a un ensayo evaluado por simple mortalidad, y la evidencia en cuanto que un fungicida aplicado al suelo temprano reduce la mortalidad inicial y por ende la posibilidad de infecciones desde el suelo en etapas mas avanzadas de desarrollo, llevó a cambiar la prueba por una de fungicida aplicado al follaje.

Para ello, plantas de cuatro meses fueron decapitadas e inoculadas mediante microgota (20 μ L por planta) con suspensión de esporas correspondiente a mezcla 4641 y 6522 ($1 \cdot 10^3$ esporas/mL). A las plantas se les aplicó fungicida tebuconazole, en dosis equivalente a 1 L/ha, según los tratamientos que se describen en la Tabla 5.1-1.

La evaluación se realizó después de tres meses, se midió la longitud de la necrosis y la altura de las plantas.

Tabla 5.1-1. Tratamientos empleados para la aplicación de tebuconazole.

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo, sólo inoculación
Te I	Aplicación de tebuconazole e inoculación posterior
I Te	Inoculación y posterior aplicación de tebuconazole

Resultados y Discusión

a) Pruebas *in vitro*.

En la primera prueba se observa que difenoconazole y fludioxonil son capaces de inhibir el crecimiento de *F. circinatum* en medio de cultivo; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con el fungicida difenoconazole (Tablas 5.1.1-1 y 5.1.1-2, Figura 5.1.1-1)

Tabla 5.1.1-1. Crecimiento radial de colonias de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo con fungicidas.

Concentración (ppm)	Crecimiento (radio, en cm)	
	Difenconazole	Fludioxonil
100	0,2	1,8
50	0,3	2,6
10	0,9	3,3
1	2,4	2,3
0	4,1	

Tabla 5.1.1-2. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *F.circinatum* en medio de cultivo con diversas concentraciones de los fungicidas.

Concentración (ppm)	Inhibición (%)	
	Difenconazole	Fludioxonil
100	95,1	56,1
50	92,6	36,5
10	78,0	19,5
1	41,4	43,9
0	100	

Fludioxonil presenta menor inhibición de crecimiento a igual concentración y, además, la respuesta es irregular.



Figura 5.1.1-1. Crecimiento radial de colonias de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de fungicidas y testigo.

En el segundo estudio se probó los fungicidas tebuconazoles y captan, además de difenoconazole y fludioxonil. Se observa que tres fungicidas son capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium circinatum* en medio de cultivo: tebuconazoles, difenoconazole y fludioxonil, captan no presenta respuesta de control; los mejores resultados se logran con el fungicida tebuconazole (Tabla 5.1.1-3, Figuras 5.1.1-2 y 5.1.1-3).

Tabla 5.1.1-3. Crecimiento radial de colonias de *F. circinatum* en medios de cultivo con fungicidas.

Concentración (ppm)	Crecimiento (radio, en cm)			
	Captan	Fludioxinil	Difenoconazole	Tebuconazole
100	4,0	1,1	0,3	0,0
50	4,1	1,2	0,3	0,0
10	4,0	1,4	0,8	0,0
1	3,7	1,3	1,3	0,2
0 (testigo)	4,2			

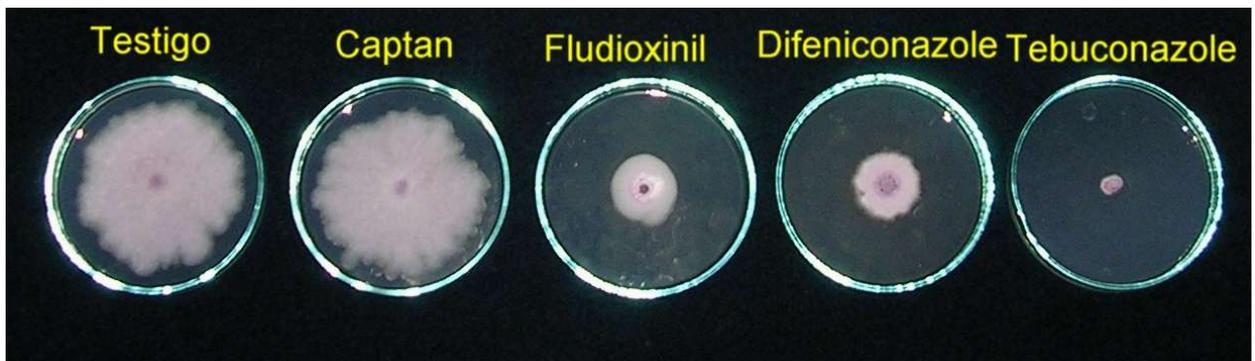


Figura 5.1.1-2. Crecimiento radial de colonias de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo con una concentración de 1 ppm de fungicidas y testigo.

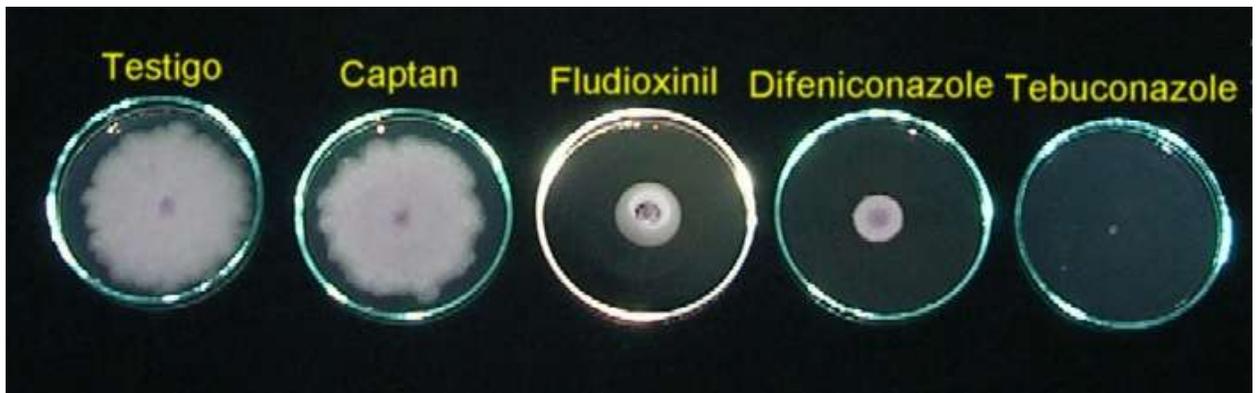


Figura 5.1.1-3. Crecimiento radial de colonias de *Fusarium circinatum* en medios de cultivo con una concentración de 10 ppm de fungicidas y testigo.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar los productos tebuconazole y difenoconazole para pruebas en invernadero.

b) Pruebas en suelo en invernadero.

Los fungicidas tebuconazole y difenoconazole disminuyen en todas las concentraciones probadas la mortalidad asociada a *F.circinatum* en el suelo con respecto al testigo inoculado, tratamiento donde todas las plantas emergidas mueren por *F.circinatum* (Tabla 5.1.2-1).

Tabla 5.1.2-1. Emergencia y mortalidad en ensayo de aplicación de fungicidas al suelo.

Producto	Dosis	Emergencia	Sobrevivientes	Mortalidad (%)
Tebuconazole	50	47 *	45	4,3
	100	35 *	35	0
	200	30 *	29	3,3
	400	28 *	26	7,1
	800	29 *	26	10,3
Difenoconazole	50	55	53	3,6
	100	38 *	33	13,2
	200	45 *	43	4,4
	400	39 *	36	7,7
	800	45 *	40	11,1
Testigo no inoculado		67	58	13,4
Testigo inoculado		26 *	0	100

* a= 0,05.

La emergencia en los tratamientos con fungicidas es menor que el tratamiento testigo libre de *F.circinatum*, excepto la dosis mas baja de difenoconazole. Así mismo cuando se tiene un periodo medio de emergencia de 27,2 para el testigo no inoculado, para los fungicidas el PME alcanza 41,5. La menor emergencia en los tratamientos podría haber sido atribuida a ataques de pre-emergencia, como ocurre en el testigo inoculado, pero el período de emergencia mayor indica un efecto de fitotoxicidad.

La posibilidad de controlar la enfermedad con aplicaciones al suelo existe y estudios subsecuentes deberán establecer las dosis de aplicación comercial.

c) Pruebas de fungicida al follaje.

Al término del ensayo se encontró que el fungicida no tuvo efecto sobre el desarrollo de la enfermedad (Tabla 5.1.3-1). Este resultado sin embargo, no descarta la posibilidad de uso del fungicida por cuanto, en este ensayo, como en otros realizados en invernadero, la alta carga de inóculo es constante, situación que no ocurre en invernaderos o sombreaderos donde las plantas con síntomas se retiran antes que la enfermedad pase a un estado contagios. Por otra parte, también es corriente que en producción, se aplique los fungicidas con mayor frecuencia.

Tabla 5.1.3-1. Severidad del a enfermedad en plantas tratadas con tebuconazole.

Tratamiento	Tamaño necrosis (%)
I Te	21,3 a
Te I	25,9 a
T0	27,2 a

4.44.NOMBRE DE LA META.

META 2

5.1. Control químico

4.44.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.1.4. Sanitización: uso de desinfectantes de contenedores, sustratos y otros.

4.44.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La “sanitización” como procedimiento de control es un término general que se aplica a cualquier medida que tienda a disminuir la posibilidad de contacto entre inoculo y huésped. Corresponden a sanitización medidas tan diferentes como rodiluvios, uso localizado de maquinarias, eliminación de individuos enfermos o limpieza de los contenedores.

Son escasas las medidas de sanitización cuya eficacia en el control pueda ser evaluada en forma sistemática. En viveros que producen plantas a raíz cubierta solamente los contenedores pueden permanecer infestados de una producción a otra (James *et al.* 1988, Cram 2002; Dumrose *et al.* 2002).

Material y método

Originalmente este estudio estaba diseñado para ser ejecutado en ambientes abiertos dado el alto número de bandejas que se usarían (200 unidades). La Resolución del Servicio Agrícola y Ganadera que declaran a *F.circinatum* de control oficial obligó a realizar la prueba en ambientes cerrados y apropiados, pero en el invernadero construido para los estudios, en la Controladora de Plagas Forestales, es posible solamente manejar un máximo de 96 bandejas.

Visto lo anterior se decidió efectuar pruebas directas de tratamientos sobre corteza y sobre tubos de pvc flexible.

Tratamientos sobre corteza

La corteza fue inoculada mediante aspersión de suspensión $1 \cdot 10^3 \text{ mL}^{-1}$, luego se mantuvo en incubación durante 72 horas y se aplicaron los siguientes tratamientos:

- 1). Hipoclorito 1% como aspersión.
- 2). Sanosil 1% como aspersión.
- 3). Calor - 60° C durante 1 hora.
- 4). Calor - 80° durante 1 hora.
- 5). Calor - 100° durante 1 hora.
- 6). Testigo sin tratamiento.

Después de 24 horas se realizó la siembra de 10 mg de sustrato en placas Petri con medio selectivo NSM

La unidad experimental fue un tubete con 10 repeticiones.

Tratamientos de tubetes

Los tubetes fueron inoculados por aspersión de esporas de *F. circinatum* en suspensión 1×10^3 mL⁻¹ en agar agua 1% y se dejaron en incubación por 72 horas, luego se aplicaron los mismos tratamientos descritos para corteza, pero en el caso del hipoclorito y sanosil se realizó inmersión por 30 segundos y en los tratamientos con calor, se aplicaron las temperaturas correspondientes durante 30 segundos (inmersión en agua caliente).

La unidad experimental correspondió al tubete y se realizaron 10 repeticiones.

Después de 24 horas de aplicados los tratamientos se cortaron pequeños segmentos de los tubetes a diferentes alturas y se sembraron en placas Petri con medio selectivo NSM.

Resultados

Tratamientos sobre corteza.

Se encontró que los tratamientos con hipoclorito y calor (80 y 100°C) fueron capaces de eliminar completamente a *F. circinatum* desde el sustrato (Tabla 5.1.4-1). Sanosil no fue capaz de eliminar completamente a *F. circinatum*, sin embargo, logró disminuir el inóculo, por lo que se podrían realizar estudios con dosis más altas que permitan controlar al patógeno.

Tabla 5.1.4-1. Presencia de *F. circinatum* en los tratamientos de sanitización de sustrato.

Tratamiento	<i>F. circinatum</i> (ufc/g) *	Otros (ufc/g) *
Hipoclorito	0,0 ^a	16,7 ^a
Sanosil	200,0 ^b	1950,0 ^b
Testigo	383,3 ^c	2216,7 ^b
Calor (60 °C)	133,3 ^b	333,3 ^a
Calor (80 °C)	0,0 ^a	83,3 ^a
Calor (100 °C)	0,0 ^a	0,0 ^a

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Tratamientos de Tubetes.

Al realizar la sanitización de tubetes se encontró que tanto hipoclorito de sodio, Sanosil y la aplicación de calor (80 y 100 °C) fueron capaces de eliminar completamente a *F. circinatum* (Tabla 5.1.4-2), sin embargo, otras especies de hongos sólo fueron eliminados con la aplicación de calor (80 y 100 °C).

Tabla 5.1.4-2. Presencia de *F. circinatum* en los tratamientos de sanitización de tubetes.

Tratamiento	Aislamiento desde tubetes (%)	
	<i>F. circinatum</i>	Otros
Hipoclorito	0	20
Sanosil	0	70
Testigo	90	100
Calor (60 °C)	70	40
Calor (80 °C)	0	0
Calor (100 °C)	0	0

Puede concluirse que el calor sobre 80° C y Hipoclorito de sodio 1% pueden minimizar el inoculo de *F.circinatum* presente en sustrato o tubetes.

4.45.NOMBRE DE LA META.

META 5

5.2. Control Cultural

4.45.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.2.1. Cultivo intercalar

4.45.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

Algunas enfermedades de cultivos donde los propágulos del patógeno permanecen en el suelo pueden ser controladas intercalando un cultivo no huésped con alguna acción deletérea sobre el patógeno entre dos cultivos sucesivos del cultivo que se desea proteger. Pinkerton *et al.* (2000) prueban el efecto de algunos cultivos sobre varios patógenos del suelo. Blok *et al.* (2000) prueban el efecto de brócoli y algunos pastos y Bryford (s.f) indica que alfalfa ha sido recomendada para el control de *F.oxisporum* var. *vasinfectum*.

La posibilidad de disminuir las poblaciones de *F.circinatum* en suelo de viveros se probará usando avena, brócoli y repollo como cultivos intercalares en un sistema en macetas.

Material y método.

Originalmente, este estudio estaba planificado para ser llevado a cabo en el suelo de un vivero con infestación conocida de *F.circinatum*. Las resoluciones SAG aplicadas al patógeno no permiten este tipo de estudio por lo que se rediseñó para su ejecución en recipientes de plástico, amplios (40 cm de diámetro), de 20 L de capacidad.

Las gamellas fueron llenadas con suelo del vivero Carlos Douglas, de textura arenosa, y este fue tratado con formalina 2% y colocadas al exterior de invernadero, bajo cubierta de malla, en el

vivero Carlos Douglas. Una semana después el suelo fue inoculado con *F.circinatum* preparado sobre granos de avena (Viljoen *et al.*) y sembrado con pino que se dejó crecer durante 90 días y se levantaron, luego se tomó una muestra de suelo para determinar la carga (ufc) inicial de inóculo en cada gamella.

El suelo inoculado fue sembrado con avena, repollo, brocoli, y pino. La unidad experimental fue una gamella y el número de repeticiones fue 5.

Iniciada la emergencia de los cultivos se comenzó a observar daño que fue en aumento de roedores. Visto lo anterior se logró colocar las gamellas resebradas dentro de un invernadero pero pasado cerca de dos meses debieron volver al exterior, donde volvió a ocurrir daño por roedores. Dada esta repetición del daño, y el tiempo perdido, se decidió aplicar algunos tratamientos como productos, de este modo se aplicó a las gamellas correspondientes avena, repollo y broccoli, en cantidad equivalente a 10 ton ha⁻¹ parcialmente triturados e incorporados en el suelo, luego se espolvoreó entre los recipientes con suelo, TMTD como repelente y las gamellas se cubrieron con mallas. Cuatro meses más tarde se efectuó la siembra de pino que fue nuevamente afectada por roedores, por lo que las gamellas se debieron colocarse bajo un tunel de malla para evitar mayor daño.

El efecto de los tratamientos fue evaluado por el número de unidades formadoras de colonia en cada recipiente. Estas mediciones se realizaron al inicio del estudio, antes de incorporar la avena, repollo y brócoli (después del daño por roedores) y al final del estudio.

Resultados

Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo. Se encontró que en todos los tratamientos en inóculo disminuye en el tiempo, pero, en el caso de repollo se logró disminuir la presencia de inóculo en forma significativa a partir de la segunda medición (Tabla 5.2.1-1).

Tabla 5.2.1-1. Densidad de inóculo de *Fusarium circinatum* en el suelo.

Cultivo	Inóculo inicial (UFC/gr suelo)*	Inóculo medición 2 (UFC/ gr suelo)*	Inóculo término de estudio (UFC/ gr suelo)*
Avena	650 ^a	322 ^a	132 ^a
Brocoli	533 ^a	350 ^a	175 ^a
Repollo	560 ^a	80 ^b	37 ^b
Pino	476 ^a	406 ^a	280 ^a

*En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$)

A pesar que en las condiciones en que se desarrolló el cultivo con repollo no se eliminó completamente el patógeno del suelo, se logró disminuir el inóculo, por lo que sería necesario realizar más estudios sobre el posible rol que puede cumplir el cultivo con repollo en la cantidad de *F. circinatum* en el suelo.

Literatura consultada

- Block, W.J., Lamers, J.G., Termorshuizen, A.J. y Bollen, G.J. 2000. Control of soil borne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by terping. *Phytopathology* 90: 253-259.
- Bryford, D. s.f. Descriptions of fungi and bacteria. *Fusarium vasinfectum*.
<http://pest.cabweb.org/Descriptions/vasinfectum.html>
- Pinkerton, J.N., Ivors, K.L., Miller, M.L. y Moore, L.W. 2000. Effect of soil solarization and cover crops on population of selected soil borne pathogens in Western Oregon. *Plant Disease* 84: 952-960.
- Viljoen, A. Wingfield, M.J. and Marassas, W.F.O. 1994 First report of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.

4.46.NOMBRE DE LA META.

META 2

5.2. Control Cultural

4.46.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.2.2. Rol de fertilizantes en la incidencia de la enfermedad.

5.2.2.a. Efecto de dosis creciente de nitrógeno en plantas inoculadas (tallos y ápices) con *F. circinatum*.

4.46.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El posible efecto contribuyente de exceso de nitrógeno sobre la severidad o incidencia de cancro resinoso ha sido propuesto por varios autores. Wilkinson *et al.* (1977) señala que la incidencia del cancro resinoso aumenta con aplicaciones de guano de pollo y con fertilización. Los estudios de Fraedrich y Witcher (1982) también apuntan a que el nitrógeno tendría un rol favorable a la mayor severidad de los canchros asociados a ataques de *F.circinatum* en diferentes especies de *Pinus* cultivados en el sur de los Estados Unidos.

Material y Método.

Plantas de pino de 18 meses, producidas a raíz cubierta, fueron transplantadas a macetas de 2 L, llenadas con suelo de textura arenosa, no cultivado, y mantenidas durante 20 meses antes de ser inoculadas.

Las plantas fueron fertilizadas, según tratamientos, en forma periódica, quincenalmente, durante diez meses, dado que el substrato de arena en el que se mantenían las plantas presentaba alta percolación y muy escaso contenido en materia orgánica.

Las dosis de nitrógeno probadas fueron 50, 100, 200 y 400 u ha⁻¹, aplicada como urea. La inoculación (Octubre 2006) se realizó de dos modos en distintos grupos de plantas: decapitando las plantas a la altura del meristema subápical y en incisión en bisel en la base del tallo con 20 µL de

una suspensión de esporas 1×10^4 de las cepas 4641 y 6522. La unidad experimental fue la planta, y el número de repeticiones fue 10.

Se evaluó, la longitud de la necrosis en el tallo, el porcentaje de anillamiento del cancro (sólo en inoculaciones realizadas al cuello) en la zona de inoculación y la mortalidad de plantas (se consideraron plantas muertas, aquellas que presentaban síntomas de marchitamiento y clorosis).

Para el caso de las inoculaciones realizadas en el ápice de las plantas, se realizó análisis de covarianza, considerando como covariables la cantidad de verticilos más próxima al punto de inoculación y una variable indicadora que señala si la necrosis paso o no el verticilo más cercano al punto de inoculación. En las inoculaciones al cuello sólo se consideró como covariable el diámetro de las plantas. Para la comparación de medias se emplea la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados y Discusión

En las inoculaciones realizadas en el ápice no se observó mortalidad de las plantas, las plantas con altas dosis de N presentaron mayor severidad de la enfermedad, casi el doble en comparación con el testigo (Tabla 5.2.2.a-1). Este resultado confirmaría lo sostenido por Fraedrich y Witcher (1982) en cuanto a un rol del nitrógeno en la severidad de la enfermedad. Sin embargo, otros sistemas de inoculación no son conclusivos (Tabla 5.2.2.a-2, Tabla 5.2.2.a-3).

Tabla 5.2.2.a-1. Longitud de la necrosis en inoculaciones realizadas al ápice

Dosis N (u/ha)	Longitud necrosis (cm) *
0	5,7 a
50	8,5 b
100	7,9 ab
200	11,3 c
400	10,8 c

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas.

En el caso de las inoculaciones realizadas en el cuello se encontró que sólo ocurrió mortalidad en las dosis 100, 200 y 400 u/ha (Tabla 5.2.2.a-2), y que la severidad fue significativa a partir de 100 u/ha, tanto en la longitud de los canchros, como en el porcentaje de anillamiento (Tabla 5.2.2.a-3).

Tabla 5.2.2.a-2. Mortalidad y supervivencia de las plantas inoculadas.

Dosis N (u/ha)	Diámetro de cuello (cm)	Muertas (%)	Vivas (%)
0	15,5	0	100

50	19,1	0	100
100	18,3	10	90
200	15,1	20	80
400	15,0	10	90

Llama la atención la ausencia de respuesta en crecimiento, medida como diámetro de cuello, de las dosis más altas del fertilizante aplicado, no se tiene explicación con las observaciones tomadas de este resultado.

Tabla 5.2.2.a-3. Longitud de canchros y % anillamiento en inoculaciones realizadas al cuello de la planta

Dosis N (u/ha)	Longitud necrosis (mm)*	Anillamiento (%)*
0	38,0 a	22,0 a
50	40,9 a	29,0 a
100	96,0 b	81,0 b
200	126,0 b	92,0 b
400	96,5 b	67,0 b

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas

La fertilización nitrogenada en dosis de 100 u N ha⁻¹ o más aumentan tanto la longitud de los canchros como el % de anillamiento del tallo. A pesar que no existen diferencia significativas, se aprecia en los resultados que la dosis 400 u/ha presenta una severidad menor a la dosis de 200 u/ha (Tablas 5.2.2.a-1 y Tabla 5.2.2.a-3).

Normalmente, los viveros deben utilizar fertilizantes nitrogenados en forma necesaria sin que se conozca el efecto de esta fertilización sobre la incidencia de la enfermedad. Los resultados obtenidos se aplican a la severidad de la enfermedad con inoculaciones artificiales, siendo necesario considerar este aspecto en nuevos estudios.

Literatura consultada

Fraedrich, B.R. y Witcher, W. 1982. Influence of fertilization on pitch canker development on three southern pines. Plant Disease 66: 938-940.

Wilkinson, R.C., Underhill, E.M., McGraw, J.R., Pritchett, W.L. y Schmidt, R.A. 1977. Pitch canker incidence and fertilizer insecticide treatment. Univ. Florida Inst. Food Agric. Sci. Progress Report 77-1. 4pp.

4.47.NOMBRE DE LA META.

META 2

5.2. Control Cultural

4.47.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.2.2. Rol de fertilizantes en la incidencia de la enfermedad.

5.2.2.b. Efecto de N, P, K y B en plantas inoculadas con *F. circinatum* en la severidad de la enfermedad.

4.47.2. AVANCE A LA FECHA

Introducción

Muchas opiniones consideran que altos niveles de fertilización ayudan a incrementar la severidad e incidencia del cancro resinoso (Barrows-Broadus y Dwinell, 1984; Dwinell *et al.*, 1985; Blakeesle y Rockwood, 1999). Los trabajos de Fraedrich y Witcher (1982) indican que fertilización con NPK aumenta la severidad de la enfermedad.

Dada la normal exigencia en fertilización de la producción de plantas se busca en este estudio confirmar la relación entre fertilización y severidad de la enfermedad en pino radiata en el país.

Material y método

Plantas de pino de 18 meses, producidas a raíz cubierta, fueron transplantadas a macetas de 2 L, llenadas con suelo de textura arenosa, no cultivado, y mantenidas durante 20 meses antes de ser inoculadas.

Las plantas fueron fertilizadas, según tratamientos, en forma periódica, quincenalmente, durante diez meses, dado que el sustrato de arena en el que se mantenían las plantas presentaba alta percolación y muy escaso contenido en materia orgánica.

Los tratamientos probados fueron NPK, NP, NK, PK, N, P, K y testigo sin fertilización. Las dosis de fertilizante fueron 100-100-100 u ha⁻¹, aplicada como urea, superfosfato triple y cloruro potasio. La inoculación (Octubre 2006) se realizó en incisión en bisel en la base del tallo aplicando 20 µL de una suspensión de esporas 1*10⁴ de las cepas 4641 y 6522.

Se evaluó, la longitud de la zona de necrosis a lo largo del tallo, el porcentaje de anillamiento del cancro en la zona de inoculación y la mortalidad de plantas (se consideraron plantas muertas, aquellas que presentaban síntomas de marchitamiento y clorosis).

Para el análisis de los datos se realizó análisis de covarianza, considerando como covariable el diámetro de cuellos de las plantas, para la comparación de medias se empleó la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados y Discusión

Al término del ensayo se encontró que las plantas presentaban diámetros de cuello promedio desde 10 cm (PK) hasta 17,6 cm (NPK) y una mortalidad que varió desde 0% (tratamientos NK y N) a un 40 % (tratamientos NPK y PK) (Tabla 5.2.2.b-1). Además se observó que algunas plantas a pesar de tener un anillamiento del 100 % del tallo, aun estaban vivas. En cuatro plantas que estaban muertas se observó la formación de esporodoquio alrededor del punto de inoculación.

Tabla 5.2.2.b-1. Mortalidad y supervivencia de las plantas inoculadas.

Tratamiento	Diámetro de	Muertas	Vivas (%)
-------------	-------------	---------	-----------

	cuello (cm)	(%)	
NPK	17,6	40	60
NP	16,4	30	70
NK	16,0	0	100
PK	10,0	40	60
N	16,6	0	100
P	15,0	20	80
K	12,8	10	90
T0	11,6	30	60

No se encontraron diferencias significativas, tanto en la longitud de los canchros con el anillamiento del tallo con los distintos regímenes de fertilización (Tabla 5.2.2.b-2), lo que indica que para las condiciones del estudio, los fertilizantes estudiados no tienen efecto en la severidad de la enfermedad.

Tabla 5.2.2.b-2. Tamaño promedio de los canchros y % de anillamiento en plantas sometidas fertilizaciones con NPK.

Tratamiento	Longitud necrosis (mm)*	Anillamiento (%)*
NPK	138,4 a	73,2 a
NP	129,5 a	68,1 a
NK	120,3 a	65,3 a
PK	107,7 a	70,7 a
N	94,2 a	60,9 a
PK	98,8 a	64,4 a
K	92,2 a	65,1 a
T0	109,1 a	72,9 a

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Los resultados obtenidos muestran un nulo efecto de la fertilización completa sobre la severidad de la enfermedad en plantas de pino radiata mayores de 18 meses y son diferentes a los obtenidos por Fraedrich y Witcher (1982) quienes obtienen un claro efecto de la fertilización NPK en la longitud de los canchros en pruebas sobre *P.elliotti* var *elliottii*, *P.virginiana* y *P.taeda*. Es posible que la respuesta de *P.radiata* a la fertilización NPK sea diferente a la de las otras especies ensayadas.

Literatura consultada

Barrows-Broadus J., y Dwinell, L.D. 1984. Variation in susceptibility to the pitch canker fungus among half-sib and full-sib families of Virginia pine. *Phytopathology* 74: 438-444.

- Blakeslee G.M. y Rockwood, D.L. 1999. Variation in resistance to pitch canker in slash and loblolly pines. Pp. 70-75 In: Devey, M.E., Matheson, A.C. y Gordon, T.R. (eds) Current and potential impact of pitch canker in radiata pine. Proc. IMPACT Monterey Workshop, Monterey CA., 30 Nov to 3 Dec.1998.
- Dwinell, L.D., Barrows-Broadus, J., y Kuhlman, E.G. 1985. Pitch canker: a disease complex. Plant Disease 69: 270-276.
- Fraedrich, B.R. y Witcher, W. 1982. Influence of fertilization on pitch canker development on three southern pines. Plant Disease 66: 938-940.

4.48.NOMBRE DE LA META.

META 2

5.2. Control Cultural

4.48.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.2.2. Rol de fertilizantes en la incidencia de la enfermedad.

5.2.2.c. Efecto de la deficiencia nutricional asociadas a severidad de la enfermedad.

4.48.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción.

La relación entre fertilización con NPK y la severidad de los canchros causados por *F.circinatum* ha sido demostrada por Fraedrich y Witcher (1982). No hay información sobre el efecto de deficiencias nutricionales en la incidencia o severidad del cancro resinoso.

Material y Método

Plantas de pino de 18 meses, producidas a raíz cubierta, fueron transplantadas a macetas de 2 L, llenadas con suelo de textura arenosa, no cultivado, y mantenidas durante 20 meses antes de ser inoculadas con riego diario.

Las plantas fueron fertilizadas, según tratamientos, en forma periódica, semanalmente, durante diez meses, dado que el substrato de arena en el que se mantenían las plantas presentaba alta percolación y muy escaso contenido en materia orgánica.

Los tratamientos probados fueron fertilización con solución nutritiva Hoagland completa, y luego, solución menos uno de cada uno de los siguientes elementos: N, P, K, Ca, Mg, y elementos menores.

Las dosis de solución aplicada fue de 100 mL maceta.

La inoculación (Octubre 2006) se realizó en incisión en bisel en la base del tallo, aplicando 20 μ L de una suspensión de esporas $1 \cdot 10^4$ de las cepas 4641 y 6522.

La unidad experimental fue la planta, y el número de repeticiones fue 10.

Se evaluó, la longitud de la necrosis en el tallo, el porcentaje de anillamiento del cancro en la zona de inoculación y la mortalidad de plantas (se consideraron plantas muertas, aquellas que presentaban síntomas de marchitamiento y clorosis).

Se realizó análisis de covarianza, considerando como covariable el diámetro de cuellos de las plantas, para la comparación de medias se emplea la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados

Al término del ensayo se encontró que las plantas presentaban diámetros de cuello promedio desde 13,4 mm (sin Mg) hasta 18,1 mm (Fertilización completa) y una mortalidad que varió desde un 0% (tratamientos sin P y sin K) a un 20 % (tratamientos sin Ca y sin micronutrientes) (Tabla 5.2.2.c-1). Además se observó que algunas plantas con anillamiento de 100 % del tallo aun estaban vivas.

Tabla 5.2.2.c-1. Mortalidad y supervivencia de las plantas inoculadas.

Tratamiento	Diámetro de cuello (cm)	Muertas (%)	Vivas (%)
Fertilización completa	18,1	10	90
Sin N	17,0	10	90
Sin P	17,4	0	100
Sin K	15,7	0	100
Sin Ca	15,4	20	80
Sin Mg	13,4	30	80
Sin Micronutrientes	16,7	20	80

En el caso de la longitud de la necrosis se encontró que los tratamientos sin N, sin Ca y sin micronutrientes presentaban cancos de menor longitud ($\alpha=0,05$) que el tratamiento sin K (Tabla 5.2.2.c-2).

Para el anillamiento no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 5.2.2.c-2).

Tabla 5.2.2.c-2. Tamaño promedio de los cancos y % anillamiento en plantas sometidas a deficiencias nutricionales.

Tratamiento	Longitud necrosis (mm)*	Anillamiento (%)*
Fertilización completa	89,2 ab	62,7 a
Sin N	77,7 a	68,0 a
Sin P	106,7 ab	65,4 a
Sin K	124,4 b	67,3 a
Sin Ca	74,6 a	54,0 a
Sin Mg	107,5 ab	69,6 a

Sin Micronutrientes	80,6	a	47,4	a
---------------------	------	---	------	---

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas

Para las condiciones del estudio, la deficiencia de K provoca mayor severidad de la enfermedad. No es posible inferir que el menor tamaño de los canchros con deficiencia de N debería considerarse como una prueba de su rol en la severidad de la enfermedad.

4.49.NOMBRE DE LA META.

META 5

5.3. Control biológico de *F. circinatum*.

4.49.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.2.3. Efecto de enmiendas orgánicas sobre la enfermedad en invernadero.

4.49.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El tema del efecto de enmiendas orgánicas no parece haber sido revisado desde que, como señala Fraedrich y Whitcher (1982), Wilkinson y otros, asociaran las irrupciones de cancro resinoso en Florida, con aplicaciones de guano de pollo y aplicaciones de fertilizantes.

Dado el uso común de enmiendas, como guano de pollo, para mejorar características físicas de suelos, especialmente de textura arenosa, se realizó un estudio del efecto de guano de pollo y de establo en la mortalidad de plantines de pino radiata.

Material y Método.

Estudio realizado en invernadero (CPF Los Ángeles) en maceteros de 3 L con una mezcla entre la enmienda y el suelo, según tratamientos.

Los tratamientos probados fueron:

- 1) Guano de establo 5% vol./vol.
- 2) Guano de establo 25% vol./vol.
- 3) Guano de pollo 5% vol./vol.
- 4) Guano de pollo 25% vol./vol.
- 5) Testigo sin enmienda, solo suelo.

Tanto el guano de pollo como el de establo estaban maduros y secos para la aplicación.

Las macetas se inocularon con 200 mg de avena inoculada y molida.

Una semana después de realizada las mezclas se sembró entre 5 y 10 semillas por macetero.

Resultados y Discusión.

El estudio se condujo por 8 meses en una sala del invernadero donde había inóculo de *F.circinatum* en el ambiente, por lo que algunas plantas sufrieron ataque aéreo que obviamente no podría ser controlado por las enmiendas en el suelo. Por esta razón, además de considerar el número de sobrevivientes (Tabla 5.2.3-2), se midió la carga de unidades formadoras de colonia (Tabla 5.2.3-1).

Tabla 5.2.3-1. Presencia de inóculo en suelo con enmiendas orgánicas.

Tratamiento	ufc/g*
T0	2527,7 a
G05	980,0 a
G25	1822,4 a
P05	1600,0 a
P25	1937,5 a

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

La cantidad de unidades formadoras de colonia recuperadas en los tratamientos es estadísticamente similar, por lo que se considera que no habría efecto de las enmiendas sobre *F.circinatum*.

Tabla 5.2.3-2. Sobrevivencia de plantas en ensayo enmiendas.

Tratamiento	Sobrevivencia (%) *
T0	40 a
G05	25 a
G25	29 a
P05	23 a
P25	20 a

* En las columnas, medias con la misma letra no poseen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Como se señaló, el número de plantas sobrevivientes se vio afectado por ataques en el follaje y tallo superior.

Este ensayo estaba diseñado para su ejecución en terreno, pero las restricciones impuestas para evitar la dispersión del patógeno impedían su realización. Por esta razón se decidió probar los tratamientos en maceteros bajo condiciones de invernadero que pueden no ser conducentes a que se produzca el efecto deseado de activación de la microflora del suelo y consecuentemente fenómenos de antagonismo u otros.

Literatura consultada

Fraedrich, B.R. y Witcher, W. 1982. Influence of fertilization on pitch canker development on three southern pines. *Plant Disease* 66: 938-940.

4.50.NOMBRE DE LA META.

META 5

5.3. Control biológico de *F. circinatum*.

4.50.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.3. Control biológico de *F. circinatum*.

4.50.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

El control biológico de enfermedades asociadas a *Fusarium* sp. en cultivos forestales está siendo estudiado por varios autores (Sinclair *et al.* 1975; Chakravarty y Hwang, 1991; Farquhar y Peterson, 1991; Ocamb *et al.* 1996).

Específicamente, en el control de *F.circinatum*, Dwinell *et al.* (1985) mencionan estudios con una especie de *Arthrobacter*, habitante de suelo y copa en plantaciones de pinos del sur de los Estados Unidos, que ha mostrado antagonismo *in vitro*, pero sin obtenerse resultados positivos en terreno. Recientemente Mitchell *et al.* (2005) probaron *Trichoderma harzianum* *in vitro* contra *F.circinatum* en Sudáfrica, comprobando la existencia de antagonismo.

El comportamiento de *F.circinatum* como un hongo en sustrato o suelo en Chile lo hace especialmente susceptible de control biológico.

Material y método

Para seleccionar las cepas de hongos antagonistas a *F. circinatum*, se empleó la técnica de cultivos en placa. Se sembró una cepa de *F. circinatum* en el disco de Petri y se sembró encima de él, inicialmente, una cepa de *Trichoderma* o lo que sea. Se observó el crecimiento de *F. circinatum* o lo que sea. Si hubo un sobrepaso de *F. circinatum* se consideró un antagonismo.

Se evaluaron 81 cepas, de las cuales 73 corresponden a *Trichoderma* spp y 8 a *Gliocladium* spp. Los resultados se muestran en las imágenes.

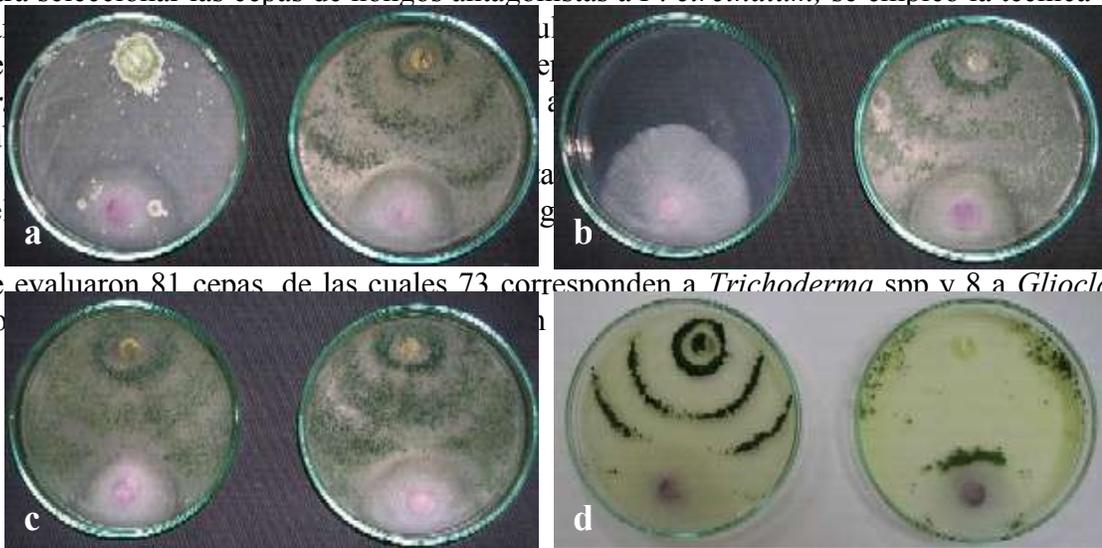


Figura 5.3-1. Ensayos “*in vitro*” del efecto de distintos aislamientos de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *F.circinatum*.

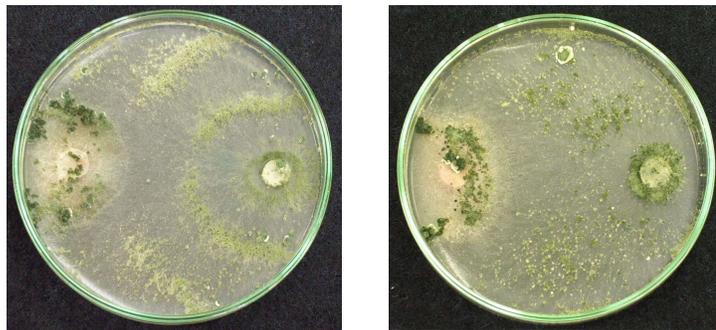


Figura 5.3-2. Efecto de antagonismo y sobrepaso sobre la colonia de *Fusarium circinatum*. Considerando que el efecto de parasitismo de *Trichoderma* o *Chlonostachis* sobre *F.circinatum* no quedó claro, excepto para una cepa, se hará un estudio específico para determinar este tipo de acción, sobre portaobjeto, con las diez mejores cepas de antagonistas.

Resultados

Las cepas con el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *F.circinatum* (mayor a 60%) fueron: UDC-024, UDC-080, UDC-109, UDC-161, UDC-163, UDC-280, UDC-294, UDC-344, UDC-345, UDC-350, UDC-351, UDC-354, UDC-360, UDC-403 y UDC-405. De éstas, la que presentó una mayor inhibición fue la cepa UDC-280, sin embargo no se observó parasitismo, pero si hubo crecimiento del antagonista sobre *F. circinatum*.

De las cepas con mayor porcentaje de inhibición, las que resultaron sospechosas de parasitismo, fueron UDC-024, UDC-080, UDC-350 y UDC-354. Es interesante observar la cepa UDC-080, que fue la cuarta con mayor porcentaje de inhibición, presentó sospechas de parasitismo y se pudo observar una alta esporulación sobre la colonia de *F. circinatum* (Tabla 5.3-1).

Si bien, no se logró determinar claramente las cepas que presentaron parasitismo, aquellas cepas que tuvieron algún tipo de enrollamiento sobre las hifas de *F.circinatum* se anotaron como “sospechosas” de parasitismo. Una de las cepas de *Gliocladium* spp (UDC-222) presentó la mayor sospecha de parasitismo de todas las cepas ensayadas.

Tabla 5.3.-1. Resultados de los cultivos pareados.

Código	Inhibición %	Parasitismo	Código	Inhibición %	Parasitismo
UDC 002	58,7	sospechoso	UDC 345	60,1	no
UDC 004	52,6	no	UDC 346	52,6	no
UDC 006	48,4	no	UDC 348	54,4	no
UDC 015	57,3	no	UDC 349	51,8	no
UDC 018	48,5	sospechoso	UDC 350	61,4	sospechoso
UDC 023	52,6	sospechoso	UDC 351	66,8	no
UDC 024	62,8	sospechoso	UDC 352	59,3	no
UDC 025	50,9	sospechoso	UDC 353	59,6	indeterminado
UDC 038	49,2	no	UDC 354	61,4	sospechoso
UDC 052	55,6	no	UDC 355	50,2	sospechoso
UDC 070	49,7	no	UDC 356	21,0	sospechoso
UDC 080	64,8	sospechoso	UDC 358	59,3	sospechoso
UDC 087	43,6	no	UDC 359	57,3	no
UDC 101	34,5	sospechoso	UDC 360	60,6	no
UDC 105	44,0	sospechoso	UDC 361	52,6	sospechoso
UDC 109	60,2	no	UDC 362	50,6	sospechoso
UDC 144	54,8	no	UDC 400	43,5	sospechoso
UDC 149	50,5	no	UDC 401	35,8	sospechoso
UDC 153	50,6	no	UDC 403	65,3	no
UDC 161	60,4	no	UDC 404	57,7	sospechoso
UDC 162	43,9	no	UDC 405	60,6	no
UDC 163	61,0	no	UDC 408	57,3	no
UDC 200	13,9	no	UDC 409	54,9	no
UDC 206	52,2	sospechoso	UDC 410	56,8	sospechoso
UDC 217	35,8	no	UDC 412	46,2	no
UDC 222	8,9	sospechoso	UDC 413	18,6	no
UDC 245	45,7	no	UDC 414	59,2	sospechoso
UDC 262	48,5	no	UDC 415	45,1	indeterminado
UDC 273	47,4	sospechoso	UDC 416	58,2	no
UDC 280	67,7	no	UDC 323	17,5	no
UDC 285	54,9	entramado	UDC 333	50,7	no
UDC 288	54,6	no	UDC 334	29,8	no
UDC 293	53,0	no	UDC 341	58,8	no
UDC 294	63,4	no	UDC 343	53,5	no
UDC 301	52,4	no	UDC 344	62,2	no
UDC 303	47,1	no	ANT 06	38,6	no
UDC 308	24,1	no	ANT 10	5,1	no
UDC 314	59,8	no	ANT 11	0,8	no
UDC 315	38,0	no	ANT 14	5,9	no
UDC 319	55,1	no	ANT 32	23,3	no
UDC 322	3,9	no			

Los resultados obtenidos en esta pruebas in vitro permitieron adelantar los estudios e incluir ensayos de invernadero (Estudio 5.3.a) con las mejores cepas seleccionadas.

Literatura consultada

- Chakravarty, P. y Hwang, S.P. 1991. Effect of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* on *Fusarium* damping off in *Pinus banksiana* seedlings. European J. Forest Pathology 21: 97-106.
- Dwinell, L.D., Barrows-Broadus, J. y Kuhlman, E.G. 1985. Pitch canker: a disease complex of southern pines. Plant Disease 66: 938-944.
- Farquhar, M.L. y Peterson, R.L. 1991. Later events in suppression of *Fusarium* root rot of red pine seedlings by ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. Canadian Journal of Botany 69: 1372-1388.
- Ocamb, C.M., Bushena, C.A. y O'Brien, J. 1996. Microbial mixtures for biological control of *Fusarium* disease of tree seedlings. Nac. Proc.: Forest and Conservation Nursery Assoc. <http://www.na.fs.fed.us/spfo/rngr/pubs/np96/microbial.htm>
- Sinclair, W.A., Cowles, D.P. y Hee, S.M. 1975. Fusarium root rot of Douglas fir seedlings: suppression by soil fumigation, fertility management and inoculation with spores of the fungal symbiont *Laccaria laccata*. Forestry Science 21: 390-399.

4.51.NOMBRE DE LA META.

4.51.1.NOMBRE DEL ENSAYO.

5.3.a. Prueba de antagonistas en invernadero.
--

4.51.2.AVANCE A LA FECHA

Introducción

La prueba de hongos antagonistas a *F.circinatum* en invernadero corresponde a un estudio no incluido en el programa original de estudios y pudo realizarse gracias a los resultados obtenidos en el estudio *in vitro*.

En este nuevo estudio se incluyen las mejores cepas encontradas en los cultivos pareados.

Material y método

Las 21 cepas seleccionadas se aplicaron en dos oportunidades: 7 días antes de la inoculación con *F.circinatum* y 7 días después de la inoculación del sustrato.

El sustrato fue esterilizado en autoclave y luego se llenó los tubetes, la inoculación se realizó con las cepas de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp en concentración 1×10^8 mL⁻¹ y la inoculación con *F.circinatum* con una suspensión de esporas 1×10^6 mL mL⁻¹.

Resultados

Ningún tratamiento aplicado después de inocular con *F.circinatum* presenta resultados promisorios.

Cuando se agrega primero al sustrato el organismo de control, aparecen algunos tratamientos promisorios (Tabla 5.3.a-1).

Tabla 5.3.a-1. Resultados de emergencia y supervivencia de plantas con adición de organismos de control antes y después de inocular el sustrato con *F.circinatum*.

Cepa	<i>F.circinatum</i> --- Organismo Control				Organismo Control— <i>F.circinatum</i>			
	Cavidad	Emerg	Enferm	Viva	Cavidad	Emerg	Enferm	Viva
T0	20	7	6	1	13	9	4	6
TF	20	7	7	0	20	12	12	0
002	20	5	5	0	17	12	10	2
023	21	5	5	0	19	10	6	4
032	20	7	7	0	20	15	5	10
052	20	7	7	0	19	7	7	0
080	20	5	5	0	20	10	10	0
153	20	7	7	0	20	14	10	4
161	20	2	2	0	17	13	7	6
163	20	8	8	0	18	10	10	0
200	20	5	5	0	19	13	9	4
222	20	4	4	0	19	14	2	12
280	19	1	1	0	18	10	10	0
285	20	5	5	0	19	14	13	1
294	19	4	4	0	18	13	10	3
303	20	7	7	0	20	13	12	1
314 (214)	20	8	8	0	19	11	11	0
350	19	3	3	0	17	9	9	0
351	20	1	1	0	19	11	9	2
404	20	1	1	0	19	9	9	0
408	20	8	8	0	20	12	3	9
412	20	3	3	0	19	15	8	7
416	20	6	6	0	19	13	11	2
TOTALES	458	116		1	428	269		73
EMERGENCIA		25,3%		0,8%		62,6%		27,1%

Este ensayo se vio afectado por muerte de plantas con “pudrición de tallo” y “quemadura” de cotiledones. Estos tipos de enfermedad ocurren por inoculación de propágulos desde el aire y no pueden ser controlados con aplicaciones al sustrato, constituyendo una seria distorsión de los resultados (Fig. 5.3.a-1).



Figura 5.3.a.-1. Aparición aérea de *F.circinatum* en las plantitas de *Pinus radiata* en el estudio de antagonistas de *F.circinatum*.

Los resultados obtenidos demuestran que el control biológico de *F.circinatum* sobre el sustrato es posible, si los organismos de control son permitidos de colonizar previamente el sustrato.

La emergencia promedio, aún cuando es baja (62,6%), es muy superior para una misma cepa cuando esta se aplica antes que el patógeno al sustrato que cuando se aplica después de la inoculación con *F.circinatum*. La supervivencia promedio de plantas en las aplicaciones de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. anteriores al patógeno es muy superior (27,1%) que cuando se aplica primero el patógeno (0,8%).

Hay dos cepas que entregan el mejor control. La cepa 032 tiene 66,0% de supervivencia y la cepa 222, alcanza 85,7%, ambas en una sola aplicación.

Este estudio demuestra la posibilidad de control biológico de ataques tempranos de *F.circinatum* originados desde el sustrato.

9. ACTIVIDADES DE DIFUSIÓN

Debido a que *Fusarium circinatum* fue declarado plaga cuarentenaria una vez iniciado el proyecto, no fue posible ir entregando avances parciales del proyecto debido a que pudieran llevar a error de interpretación por ser información parcial.

- El día 6 de septiembre 2005, se realizó una Mesa Redonda en la que participaron 27 personas de 17 instituciones o empresas. El temario realizado fue el siguiente:

Temario de la mesa redonda “*Fusarium circinatum* en Viveros en Chile”

TEMA	
I	Presentación General del problema
II	Presentación casos de viveros positivos:
	Vivero Los Olmos
	Vivero Quivolgo
	Vivero Los Álamos
	Vivero La Posada
	Vivero María Las Cruces
	Vivero Carlos Douglas
	Vivero Los Castaños
III	Análisis resultados de Encuesta
IV	Proposiciones de pautas comunes de control.
V	Proposiciones de calendario/periodicidad de muestras SAG

Posterior al seminario se envió a los participantes un CD con todas las presentaciones y una Minuta con las proposiciones y acuerdos tomados.



Figura 9-1. a). Portada Seminario. B). Participantes de la Mesa Redonda.

- Se presentó el trabajo “Resultados preliminares del estudio *Fusarium circinatum*: Conocimiento del Patógeno y Establecimiento de Bases para su Control” en la XX Silvotecna “Sanidad Forestal en un Mundo Globalizado” realizada en Concepción entre el 7 y 8 de noviembre de 2005.
- Entre los días 7 a 11 de noviembre de 2005 se contó con la asesoría de la Dra. Eugenia Iturrutxa del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER, de España. La Dra. Iturrutxa lleva trabajando varios años en *F.circinatum* en plantaciones exóticas de *Pinus radiata*, situación muy parecida a lo que podría suceder en Chile si la enfermedad apareciera en plantaciones. Las actividades desarrolladas por la Dra. Iturrutxa fueron las siguientes:

Fecha Nov. 2005	Actividad
7	Visita Laboratorio <i>F.circinatum</i> de la U. de Concepción. Asistencia a XX Silvotecna
8	Asistencia a XX Silvotecna
9	Visita a terreno
10	Visita a terreno
11	Reunión en CPF S.A. para intercambio final, donde participó el Comité Técnico del Proyecto.

- El día 30 de mayo de 2007, se realizó el Seminario “*Fusarium circinatum* Nirenberg & O’Donnell: conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control en *Pinus radiata*” con la que participación 46 personas de 17 instituciones o empresas. El temario realizado fue el siguiente:

HORA	TEMA
10:15 – 10:30	Inscripciones
10:30 – 10:40	Apertura Seminario
10:40 – 11:00	Antecedentes generales de <i>Fusarium circinatum</i>
11:00 – 11:40	Patogenicidad y virulencia de <i>Fusarium circinatum</i> en Chile.
11:40 – 11:55	Café
12:00 – 12:40	Patogénesis, saprogénesis y epidemiología de <i>Fusarium circinatum</i>.
12:40 – 13:10	Bases para el control de <i>Fusarium circinatum</i>.
13:10 – 13:30	Comentarios finales



Figura 9-2. Participantes del Seminario sobre *Fusarium circinatum*.

10. LOGROS ALCANZADOS

PRINCIPALES RESULTADOS

Período Incubación

- Es extremadamente variable, aun para un mismo procedimiento de inoculación, por ejemplo de 2 a 12 meses en inoculaciones artificiales tanto en la base del tallo como en ápices.
- En forma natural, por lo observado en terreno, puede tomar más de 40 meses.

Período de Latencia

- Es extremadamente variable.
- Normalmente los esporoquios comienzan a aparecer al final de la expresión de síntomas, son efímeros y no hay nuevas producciones, a pesar de estar activo el hongo.
- No ocurren en todas las plantas afectadas.
- El período de latencia no es una constante y depende del tipo de enfermedad que el patógeno esté originando: por ejemplo damping off, ataque al cuello o en la zona apical.

Patogenicidad

- Inoculado al suelo causa damping off de pre y postemergencia, y sigue causando mortalidad en plantas en el primer crecimiento secundario.
- Inoculación a la semilla causa damping off de pre y postemergencia (principalmente damping off aéreo) y sigue causando mortalidad en plantas hasta un año después.
- *F.circinatum* pasó de semillas inoculadas al suelo.

- Inoculando a la semilla y sembrando en sustrato, *F.circinatum* produce mortalidad que se inicia por las acículas inferiores en plantas de más de 5 meses.
- Inoculación al sustrato de plantas de estaca de 11 meses:
 - Inoculación por riego causa de un 10 a 100% mortalidad según cepa.
 - Inoculación por inmersión causa de un 10 a 100 % mortalidad según cepa.
 - Inoculación por semi-inmersión causa de un 0 a 20% mortalidad con las dos cepas más virulentas.
- Plantas inoculadas en meristema subapical, en rama, en rama podada y en el tronco de plantas de 6 años: Todas las inoculaciones resultaron en canchros.
- Existe variabilidad en la patogenicidad entre las cepas de *F.circinatum* tanto en inoculaciones al suelo como en plantas de diferentes edades.

Saprogenesis Permanencia del Hongo en Sustrato y Planta

- El hongo queda en el sustrato donde ha habido plantas muertas por *F.circinatum*.
- *F.circinatum* en el suelo disminuye su población drásticamente en los primeros 5 a 6 meses y permanece por 24 meses en suelo natural y 20 meses en arena libre de materia orgánica, en forma viable y capaz de producir enfermedad (canning off)
- *F.circinatum* no colonizaría internamente las partículas pero crece sobre el sustrato.
- Sobrevive en sustrato por más de 12 meses a 22°C.
- El hongo permanece por lo menos hasta 24 meses en la madera de plantas afectadas.
- El hongo se encuentra infectando solo a la zona del canchro y no en toda la planta, pero inoculado al ápice se mueve hacia abajo como canchro difuso.
- *F.circinatum* crece en rodajas frescas y papel filtro, pero no sobre madera elaborada seca.

Epidemiología en Jardín de Setos

- No se presenta en los brotes de plantas afectadas con canchros en el cuello.
- En un caso (setos > 2 años) presenta distribución agregada y en otro aleatoria (seto < 1 año), en evaluaciones realizadas en el mismo predio.
- El incremento de la enfermedad es decreciente y se ajusta a un modelo monomolecular.
- No hay contagio horizontal.
- El hongo no es sistémico.

Epidemiología en Plantaciones

- No hay diseminación planta a planta (por tipo de síntomas y su ubicación).
- La tasa de incremento es decreciente.
- El problema presenta distribución aleatoria y ocurre como plantas aisladas.
- En el replante de 114 plantas sanas exactamente en el mismo punto de donde se sacó una planta enferma, se han detectado 6 plantas con presencia de *F.circinatum*. El patógeno puede hacer un ciclo planta enferma a suelo a planta sana replantada. En este resultado debe considerarse que el período entre extracción de planta muerta y replante fue inmediato a la extracción.

Epidemiología Rol de Insectos

- No se ha determinado presencia de *F.circinatum* sobre *Hylurgus ligniperda*, pero si la presencia de otras especies de *Fusarium*.
- No se ha determinado hasta la fecha sobre brotes atacados por *Rhyacionia buoliana*.
- Los insectos (*Rhyacionia buoliana*, *Hylurgus ligniperda*) pueden llevar inoculo e inducir la enfermedad

Epidemiología presencia del hongo en aire

- Muestras, por exposición de placas Petri con medio selectivo, de hasta 3 horas en viveros positivos, no han demostrado la presencia de propágulos en el aire.
- En el invernadero donde se llevan los estudios con inoculaciones artificiales de *F.circinatum*, se ha detectado la presencia de propágulos en el aire en muestreos de 30min.

Epidemiología presencia del hongo en el agua de riego

- El agua en la barra aspersora no presenta hongos capaces de crecer en NSM, pero hay especies de *Fusarium* diferentes a *F.circinatum* en las muestras de agua tomadas sobre la planta y en el agua que escurre desde tubetes.
- *F.circinatum* ocurre en agua en sistemas donde el agua se recicla.

Asociación a otros Patógenos

- En setos se ha observado asociado a la presencia de *Phytophthora*, *Macrophomina* y *Sphaeropsis*, lo que se comprobó en cultivo.
- En raíces de plantas puede encontrarse *F.circinatum* y otros patógenos

Control Químico

- Hay productos promisorios en pruebas *in vitro* indican a tebuconazole y difenoconazole, los cuales son capaces de inhibir el crecimiento de *F.circinatum*, especialmente en el caso de tebuconazole. Captan aparece como ineficiente en el control.
- Tebuconazole y difenoconazole aplicados al suelo controlan damping off

Control Biológico

- Se ha observado *Trichodermas* que inhiben el crecimiento de *F.circinatum* o lo cubren o lo parasitan.
- El control biológico es ineficiente cuando el substrato se inocula primero que el antagonista, pero cuando se agrega primero el antagonista, se obtiene protección adecuada contra damping off o ataques tempranos.

IMPACTOS

El primer impacto del proyecto fue la realización de la Mesa Redonda “*Fusarium circinatum* en Viveros en Chile” donde, por primera vez, se pudo reunir a los viveristas que manejan los viveros con detección positiva a *F.circinatum* y personal del SAG, para intercambiar la experiencia obtenida en el manejo y prospección de esta plaga, lográndose importantes acuerdos al respecto.

Uno de los impactos del proyecto después de la realización de la Mesa Redonda “*Fusarium circinatum* en Viveros en Chile”, ha sido el comenzar a implementar la técnica de diagnóstico de *F.circinatum* por análisis genómico PCR-CIRC y que tiene la particularidad que requiere un menor tiempo, una mayor exactitud y, por referencias, un menor costo.

Otro impacto importante derivado del proyecto, es el que a luz de los nuevos antecedentes que aporta éste, es necesario revisar las disposiciones que al respecto existen que buscan impedir el avance del hongo en el país.

11. RENDICIÓN DE GASTOS

A continuación se presentan las planillas de rendición de los Aportes del Servicio Agrícola y Ganadero, Aportes del Agente Ejecutor y Resumen Rendición de los Aportes del SAG y del Agente Ejecutor.

En Anexos se describe cada ítem considerado en las planillas (ver Anexo N° 1) y se adjunta fotocopias de las facturas canceladas en compendio anexo de contabilidad.

ANEXO N° 1

DESCRIPCIÓN DE ITEMS DE GASTOS

ITEM (N°)	CONCEPTO
1	RECURSO HUMANOS
2	VIÁTICOS
3	PASAJES Y TRASLADOS
4	SERVICIOS DE TERCEROS
5	CAPACITACIÓN
6	INSUMOS Y SUMINISTROS
7	MANTENCION Y REPARACIONES
8	VEHÍCULOS
9	MAQUINARIAS Y EQUIPOS
10	SISTEMAS INFORMÁTICOS
11	USO BIENES DE CAPITAL
12	GASTOS DE ADMINISTRACIÓN