



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster Universitario en Ingeniería de Montes

*Antagonismo in vivo de hongos endófitos
frente a *Fusarium circinatum*.*

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González

Tutor: Julio Javier Diez Casero
Cotutor: Pablo Martínez Álvarez

Septiembre de 2015

Copia para el tutor/a

Quiero expresar mi agradecimiento a D. Julio Javier Diez Casero, tutor del presente Trabajo Fin de Máster, por su ayuda y por la atención que de él he recibido.

Además quisiera hacer mi agradecimiento:

Muy especialmente a Pablo Martínez Álvarez por todo el tiempo que me ha dedicado y por brindarme, de nuevo, la oportunidad de trabajar con él.

A mi familia por confiar siempre en mí y su apoyo y comprensión durante todos estos años.

A Thalia y su familia, así como a mis amigos por su gran apoyo y respaldo en todo momento, sobre todo en los momentos más difíciles, así como a todos aquellos que de alguna forma han estado implicados en esto.

ÍNDICE

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

Índice.

	Pag.
Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. Descripción de la enfermedad y el patógeno <i>Fusarium circinatum</i>	8
1.2. Descripción del hospedante. <i>Pinus radiata</i>	17
1.3. Estrategias de control de la enfermedad.....	19
2. Objetivos.....	23
3. Material y Métodos.....	25
3.1. Zona de estudio.....	26
3.2. Material fúngico.....	27
3.2.1. Aislados de <i>Fusarium circinatum</i>	27
3.2.2. Hongos endófitos ensayados.....	30
3.3. Especies de pino ensayadas.....	30
3.4. Inoculación de plantas con los aislados fúngicos.....	32
3.5. Evaluación del efecto antagonista.....	34
3.6. Análisis Estadístico.....	34
4. Resultados.....	37
4.1. Análisis de variables empleadas.....	38
4.2. Susceptibilidad a <i>Fusarium circinatum</i>	41
4.3. Control Biológico con Endófitos.....	45

5. Discusión.....	51
6. Conclusiones.....	55
7. Bibliografía.....	57

RESUMEN

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

Resumen.

La enfermedad del Chancro Resinoso del Pino (CRP), es una enfermedad originaria del Sureste de EEUU y el norte de México que se encuentra extendida en la actualidad por varios países de América, Europa, África y Asia. Su posible introducción en países donde existen grandes plantaciones de pino tales como Australia y Nueva Zelanda resulta una grave amenaza. En España la enfermedad se detectó en varios viveros de *Pinus radiata* del País Vasco en 1997. Sin embargo no se declaró oficialmente hasta que en 2004 aparecieron los primeros síntomas de la enfermedad en plantaciones de *P. radiata* de 20 años en Cantabria. El organismo causante de dicha enfermedad es un hongo ascomicete denominado *Fusarium circinatum* perteneciente a la familia *Nectriaceae*. La dispersión de las esporas puede producirse mediante el viento, insectos, agua, suelo y contacto de material vegetal. Los síntomas que provoca son varios, pero sin duda el más típico y evidente es el chancro resinoso que da nombre a la enfermedad. Se trata de una herida normalmente hundida sobre el tronco o ramas gruesas y en la cual se produce una fuerte exudación resinosa. Además, el patógeno produce marchitamiento y decoloración de las acículas, desecación y muerte de los brotes terminales así como deterioro de las semillas, reduciendo la emergencia de las plántulas. En vivero provoca damping-off de pre- y post-emergencia e importantes pérdidas económicas. El hospedante más susceptible a esta enfermedad es *P. radiata*, aunque afecta a otras especies del mismo género así como del género *Pseudotsuga*. Tanto a nivel mundial como nacional, esta especie de pino supone un importante recurso económico en el ámbito forestal. En España es la conífera alóctona más utilizada para plantaciones forestales, con más de 250.000 ha. Aunque este pino ocupa un área pequeña en comparación con los pinos nativos (sólo el 3,6% de la superficie total cubierta por coníferas), supone la producción del 25% de la madera de coníferas en España. En este estudio se evaluó el efecto de seis hongos endófitos frente a *F. circinatum* sobre plantas de cinco especies de *Pinus* sp (*P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. nigra*) en campo. Estos hongos fueron seleccionados estudio previo por sus buenos efectos antagonistas frente al patógeno *in vitro*. Los resultados obtenidos confirmaron que *P. radiata* es la especie de pino más susceptible a *F. circinatum*. Igualmente *P. sylvestris* y *P. pinaster* resultaron también susceptibles a la enfermedad. Dos de los seis aislamientos de hongos endófitos evaluados, pertenecientes a las especies *Chaetomium aureum* y *Alternaria* sp., redujeron significativamente los síntomas de *F. circinatum* sobre *P. radiata*, lo que les convierte en potenciales agentes de control biológico de la enfermedad del CRP.

INTRODUCCIÓN

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

1. Introducción.

1.1. Descripción de la enfermedad y el patógeno *Fusarium circinatum*.

La enfermedad del Chancro Resinoso del Pino (en adelante CRP) es una grave patología causada por el hongo ascomicete *F. circinatum* (teleomorfo = *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell), principalmente sobre especies del género *Pinus*, y sobre *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco (abeto de Douglas). La enfermedad afecta con gran virulencia a la especie de *Pinus radiata* D. Don, que es la conífera más plantada en todo el mundo (Critchfield y Elbert, 1966). Esta enfermedad fue detectada por vez primera en la década de 1940 en el sureste de Estados Unidos de América (EEUU) sobre *Pinus virginiana* Mill. (Hepting y Roth, 1946), aunque se cree que el patógeno es endémico tanto de allí como de México (Dwinell *et al.*, 1985; Guerra-Santos, 1998). Desde entonces se ha extendido por gran parte de la geografía mundial, en muchos casos a causa de las prácticas de manejo forestal intensivo (Dwinell *et al.*, 1985). Así, hasta el momento, el patógeno ha sido detectado en Haití (Hepting y Roth, 1953), Sudáfrica (Coutinho *et al.*, 2007; Viljoen *et al.*, 1994), Japón (Kobayashi, 2007), Chile (Jacobs *et al.*, 2007; Wingfield *et al.*, 2002), Corea (Cho y Shin, 2004), Francia (EPPO, 2006), España (Landeras *et al.*, 2005; Laucirica y Muguruza, 1997), Italia (Carlucci *et al.*, 2007), Portugal (Bragança *et al.*, 2009), Uruguay (Alonso y Bettucci, 2009), Colombia (Steenkamp *et al.*, 2012) y Brasil (Pfenning *et al.*, 2014) (Figura 1). Esta enfermedad estaba dentro de la lista de cuarentena A1 de la EPPO (plagas ausentes de la región EPPO, European Plant Protection Organization) hasta el momento en que se detectó en España, pasando entonces a aparecer dentro de la lista de cuarentena A2 (plagas presentes en la región EPPO).



Figura 1. Distribución mundial de *F. circinatum*.

La primera vez que se detectó la enfermedad del CRP en la década de 1940 fue registrada como una especie sin describir del género *Fusarium* perteneciente a la sección *Liseola* (Hepting y Roth, 1946). Posteriormente fue nombrada como *F. lateritium* f. sp. *pini* (Snyder *et al.*, 1949). En la década de los 70, basándose en la abundancia de microconidios producidos en polifiálidas y la ausencia de clamidosporas, el patógeno fue renombrado como *F. moniliforme* var. *subglutinans* (Dwinell y Phelps, 1977; Kuhlman *et al.*, 1978). En 1983 el hongo pasó a considerarse una especie única que se denominó *F. subglutinans* (Nelson *et al.*, 1983). Más tarde se concluyó que estaba justificado asignar una forma *specialis* a las cepas patógenas de *F. subglutinans*, basándose en el diferente patrón de longitudes polimórficas de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial, y en la especificidad del hospedante (Correll *et al.*, 1992). Esta justificación se vio corroborada mediante análisis con isoenzimas (Huss *et al.*, 1996) y del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs) (Viljoen *et al.*, 1997). Así el hongo del CRP fue nombrado como *F. subglutinans* f. sp. *pini*.

El hongo del CRP fue descrito (Nirenberg y O'Donnell, 1998) como un miembro del llamado complejo *Gibberella fujikuroi*, el cual se corresponde aproximadamente con la sección *Liseola* de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 1998). Basándose en la morfología, llamaron a la fase asexual *F. circinatum* y a la fase sexual *G. circinata* (Nirenberg y O'Donnell, 1998). Utilizando un número limitado de aislados, los autores diferenciaron *F. circinatum* de *F. subglutinans sensu stricto*, patógeno del maíz, por sus polifiálidas con más de tres aperturas para la salida de conidios (a diferencia de las menos de tres aperturas en *F. subglutinans*), conidióforos en proliferación (los de *F. subglutinans* están fuertemente ramificados) e hifas en espiral (ausentes en *F. subglutinans* pero presentes en *F. pseudocircinatum*). Un estudio posterior en el que se incluyó una mayor colección de aislados (Britz *et al.*, 2002), se realizaron análisis filogenéticos basados en secuencias de la histona *H3* (Steenkamp *et al.*, 1999), la β -tubulina y del factor de elongación de la traducción 1 - α (O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2000), apoyó la designación de este patógeno como un taxón distinto dentro del complejo *G. fujikuroi*.

En la actualidad, existen dos métodos válidos para llevar a cabo una identificación rápida y fiable de *F. circinatum*. El primero se basa en una PCR-RFLP del gen de la histona *H3* (Steenkamp *et al.*, 1999), que implica la digestión de una porción específica de este gen con enzimas de restricción *Cfo1* y *Dde1*. La electroforesis posterior genera para *F. circinatum* un patrón de bandas único. El segundo método (Schweigkofler *et al.*, 2004), consiguió secuenciar la región separadora intergénica del ARN ribosómico en un conjunto representativo de cepas de *Fusarium*. A partir de estos datos, se diseñaron cebadores específicos para *F. circinatum*, que permiten la amplificación de un fragmento de 300 pares de bases cuando la muestra contiene ADN del patógeno del CRP. Recientemente se secuenció el genoma de *F. circinatum*, siendo el primer organismo eucariota de África con el genoma completamente secuenciado (Wingfield *et al.*, 2012).

Varios aspectos de la biología y de la ecología de *F. circinatum* han sido investigados hasta el momento. Sin embargo, en muchos casos estos trabajos se han limitado a especies de árboles o regiones geográficas concretas y los resultados generalmente se han extrapolado, a pesar de saber muy poco con respecto a la variación entre los hospedantes y los países. Los parámetros biológicos de *F. circinatum* que se han estudiado principalmente han sido: la dinámica de inoculación, la dispersión, la infección, la colonización, la supervivencia y la reproducción sexual del patógeno.

Podemos encontrar inóculo de *F. circinatum* durante todas las estaciones del año, aunque en el sureste de EEUU y California, se observó que la mayor producción de esporas se da durante el otoño-invierno (Kratka *et al.*, 1979; Schweigkofler *et al.*, 2004). También sobrevivieron más esporas durante este periodo que durante la primavera-verano (Blakeslee *et al.*, 1978). En Florida, los árboles infectados presentaban esporodoquios que contenían macroconidios (Figura 2) que infectaban comúnmente las ramas de la copa superior (Blakeslee *et al.*, 1978), y además se observó que las acículas muertas de brotes infectados, continuaban sirviendo posiblemente como fuente de inóculo (Barrows-Broadus y Dwinell, 1984). En California se detectó abundante inóculo de *F. circinatum* aerotransportado en una zona con una alta incidencia de CRP sobre *P. radiata*, pero no en las zonas donde no había evidencia de la enfermedad (Correll *et al.*, 1991). En la costa central de California, donde se sabe que CRP está presente, un estudio reveló presencia de esporas en los árboles sintomáticos y asintomáticos (Adams, 1989) presumiblemente debido a la deposición de esporas aéreas (Storer *et al.*, 1998). Se han encontrado esporas del hongo CRP en el agua de lluvia, en el aire (Kuhlman, 1982), y en trampas de esporas bajo los árboles asintomáticos (Fraedrich, 1997).

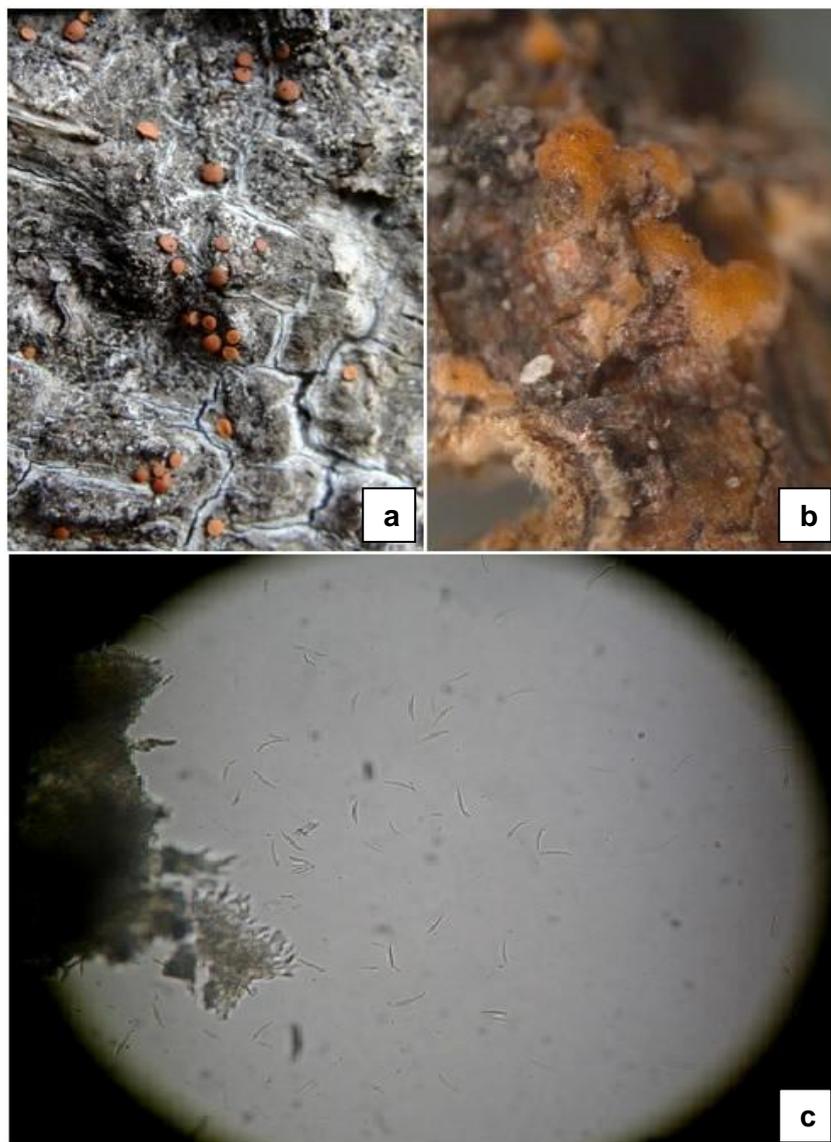


Figura 2. Detalle de esporoquios: a) esporoquios sobre la corteza necrosada del árbol; b) esporoquio visto con lupa (x6); c) vista de esporoquio con microscopio, llegándose a observar los macroconidios (x100).

La dispersión de las esporas de *F. circinatum* se puede producir a través del viento, de los insectos vectores, de salpicaduras de agua, del contacto con el mismo suelo que contiene al hongo y del movimiento de materiales vegetales infectados (Blakeslee *et al.*, 1979; Blakeslee *et al.*, 1978; Dwinell y Barrows-Broadus, 1978; Fraedrich y Dwinell, 1997; Gordon *et al.*, 2001; Hoover *et al.*, 1996; Storer *et al.*, 1998; Viljoen *et al.*, 1994; Wikler y Gordon, 2000). En el sureste de EEUU, la infección natural por esporas aerotransportadas se asocia principalmente con heridas causadas por daños físicos, tales como la poda y la cosecha de piñas, y las lesiones relacionadas con el clima, por ejemplo las heridas producidas por granizo o el viento (Dwinell y Barrows-Broadus, 1981; Dwinell y Phelps, 1977; Dwinell *et al.*, 1985; Kelley y Williams, 1982). Por el contrario, en California, la frecuencia de infección en heridas (artificiales o naturales) fue tan baja, que esta forma de infección no se consideró

importante (Correll *et al.*, 1991; Gordon *et al.*, 1998; Sakamoto y Gordon, 2006). Son los insectos los agentes más importantes de transmisión del hongo en esta zona geográfica (Barrows-Broadus y Dwinell, 1985; Inman *et al.*, 2008; Kuhlman, 1987; Sakamoto y Gordon, 2006).

Las esporas de *F. circinatum* son capaces de sobrevivir en el suelo y en residuos de madera (Dwinell y Barrows-Broadus, 1978; Gordon *et al.*, 2001). Se demostró que el patógeno puede sobrevivir durante más de 6 meses en suelo húmedo, hasta 1 año en suelo seco y más de 3 años en suelo bajo refrigeración (Barrows-Broadus y Kerr, 1981). Es relativamente común que las plantas juveniles infectadas, asintomáticas, terminen siendo plantadas y en algún momento, el hongo puede cambiar de una forma latente a una forma activa. En la actualidad, no se sabe si todas las plantas con infecciones latentes finalmente muestran síntomas del CRP o si existen mecanismos que regulan este cambio de comportamiento.

Fusarium circinatum se puede reproducir sexualmente *in vitro*, en medio de cultivo con agar (Britz *et al.*, 1999), aunque las estructuras fructíferas sexuales o peritecios de este patógeno, nunca se han observado en campo. Sin embargo, los resultados de los estudios de diversidad genética sugieren que ciertas poblaciones del patógeno se reproducen sexualmente, mientras que otras se reproducen predominantemente por mitosis (Britz *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2006; Wikler y Gordon, 2000; Wikler *et al.*, 2000). Una posible explicación para la inexistencia de peritecios en condiciones naturales, es que el apareamiento se ve favorecido por las bajas temperaturas (Covert *et al.*, 1999), mientras que los brotes de enfermedades se producen durante periodos relativamente cálidos. Cabe la posibilidad de que *F. circinatum* pueda completar su ciclo sexual en algún otro hospedante o sustrato.

Como ya se dijo anteriormente, el CRP fue descrito por vez primera sobre *P. virginiana* en el sureste de EEUU en la década de 1940 (Hepting y Roth, 1946), donde permanece en plantaciones y huertos semilleros como un problema crónico (Dwinell *et al.*, 1985). Muchos pinos de esta región del sureste estadounidense son susceptibles, incluidas especies comunes en plantaciones como *P. taeda* L. y *P. elliotii* Engelm. Cuatro años después de la primera detección de la enfermedad en sureste de EEUU, se registró en California afectando a masas de pino, principalmente de *P. radiata*, pero también de *P. muricata* D. Don, *P. pinea* L. y *P. halepensis* Mill. (McCain *et al.*, 1987). Algunos años después aumentaron tanto los hospedantes como el área de distribución del CRP, afectando a masas naturales de *P. radiata* de la península de Monterrey y a una nueva especie como era *P. menziesii* (Storer *et al.*, 1994).

En el momento de su detección en California, era natural sospechar que el hongo del CRP fuera transportado de alguna manera a California desde los estados del sureste. Esta teoría se reforzó mediante análisis genéticos que certificaron la estrecha relación existente entre cepas del hongo presentes en Florida y California (Wikler y Gordon, 2000). Fuera de EEUU esta enfermedad se registró en Haití sobre *P. occidentalis* Sw. (Hepting y Roth, 1953) y en México en varias especies de pino (Santos y Tovar, 1991). El alto número de grupos de compatibilidad vegetativa del patógeno en México, sugiere que lleva un largo tiempo presente allí (Wikler y Gordon, 2000) y por tanto se considerara que México es el lugar de origen de la enfermedad.

La enfermedad producida por el patógeno del CRP que recibe el nombre del principal síntoma que provoca, el chancro, genera daños sustanciales e importantes pérdidas económicas en las plantaciones de pino (Dwinell *et al.*, 1985), ya que causa deformaciones en el tronco que lo hacen inservible para la industria (Figura 3). El chancro por lo general aparece en el tronco o en las ramas principales, produciendo abundante resinación, empapando los tejidos que se encuentran debajo (Hepting y Roth, 1946) (Figura 4). Otros de los síntomas comunes asociados a este patógeno son la muerte regresiva (dieback), como consecuencia de la obturación que provoca el chancro en el flujo de savia, además del marchitamiento y decoloración de las acículas, que acaban por tornarse rojas y finalmente caen (Wingfield *et al.*, 2008) (Figura 5). Como resultado, el árbol termina muriendo debido a la pérdida estructural que provoca el anillamiento del chancro en el tronco. También en vivero *F. circinatum* puede reducir la germinación de las semillas, causar la torsión y muerte (damping-off) de pre- y post-emergencia, marchitamiento, fogonazos y muerte regresiva apical de las plantas (Viljoen *et al.*, 1994).



Figura 3. a) deformación en tronco causado por *F. circinatum* y b) fractura del tronco que se acaba produciendo a consecuencia del debilitamiento.

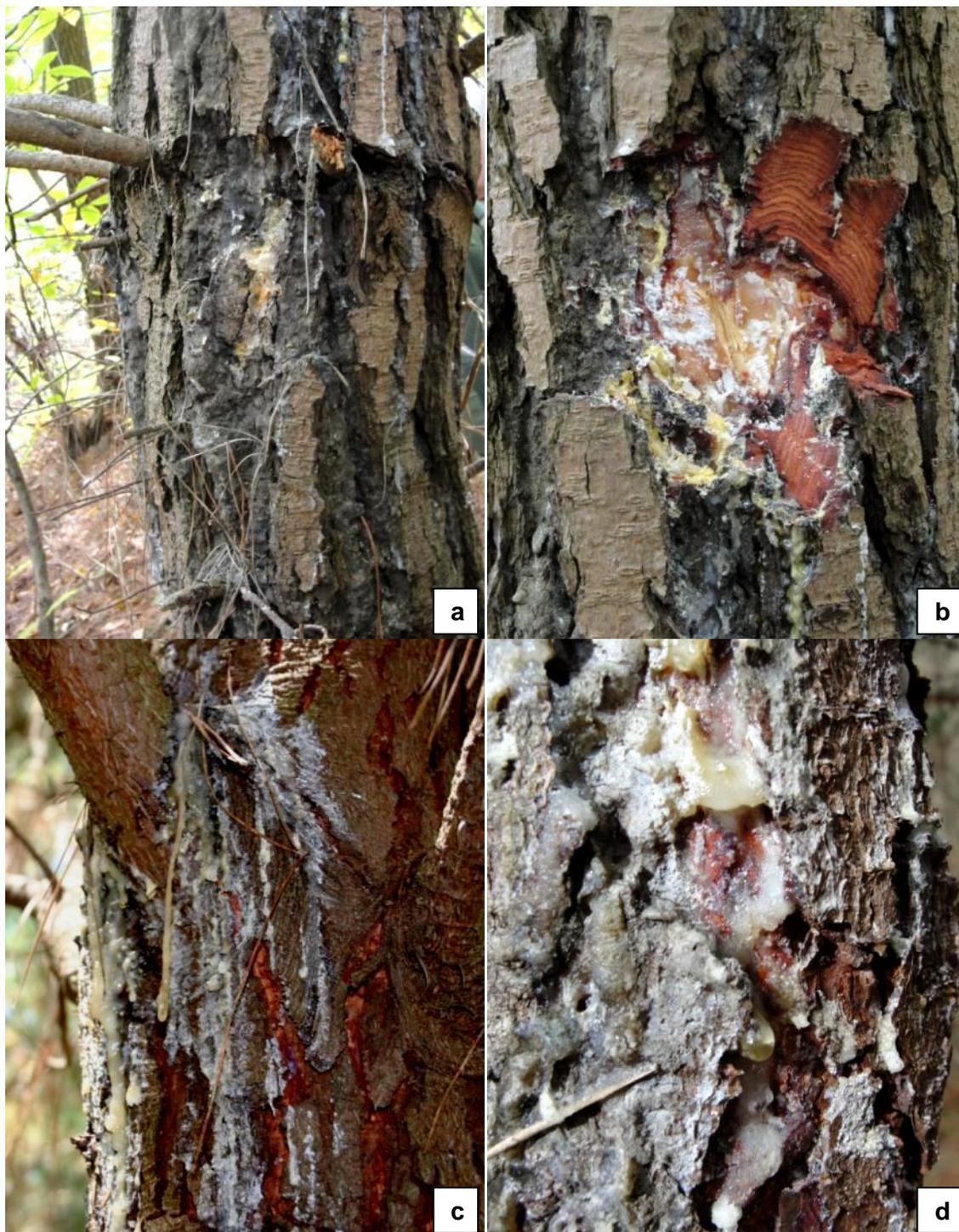


Figura 4. Distintas imágenes de chancros producidos en el tronco de *P. radiata*: a) y b) chancro en tronco y tejidos inferiores impregnados de resina; c) y d) detalle de la fuerte resinación que origina *F. circinatum*.



Figura 5. Marchitamiento de las acículas que provoca *F. circinatum* en la zona superior de la copa del árbol, provocando inicialmente la muerte de los ramillos y posteriormente del árbol.

Fuera de América, la enfermedad del CRP fue registrada por primera vez en Japón en 1989, afectando a *P. luchuensis* Mayr. (Kobayashi y Muramoto, 1989) y más recientemente también fue descrita en Corea del Sur (Cho y Shin, 2004). En 1990 el CRP apareció en África, llegando muy probablemente desde México (Bebegal *et al.*, 2013; Britz *et al.*, 2001; Wikler y Gordon, 2000), detectándose en Sudáfrica (Viljoen *et al.*, 1994) donde provocaba la pudrición radicular en plantas de vivero de *P. patula* Schiede ex Schldl. & Cham. En Sudáfrica este patógeno se consideró como una enfermedad de vivero hasta 2005, momento en que se detectó el primer brote de *F. circinatum* en una plantación de *P. radiata* (Coutinho *et al.*, 2007). También en Chile hay presencia de este patógeno (Wingfield *et al.*, 2002), cobrando especial importancia en este país, ya que *P. radiata* es una especie plantada a gran escala aquí (Fernández y Sarmiento, 2004), superando las 1.500.000 ha (78% de la superficie reforestada del país). Lo daños aquí se limitan a viveros y plantas jóvenes de entre 1 y 4 años de edad, creyéndose que los árboles adultos enfermos tuvieron su origen en la etapa de vivero (P. Moraga-Suazo *et al.*, 2014).

En Europa esta enfermedad se registra por primera vez en 2004, cuando se detecta en viveros forestales de pino de Asturias (España), afectando tanto a *P. radiata* como a *P. pinaster* Aiton. Después durante el mismo año se detectó nuevamente en el norte peninsular, en plantaciones de *P. radiata* de unos 20 años de edad en Cantabria. Sin embargo existen evidencias que sostienen que *F. circinatum* lleva presente en el país desde la década de 1990 (Dwinell *et al.*, 1998; Laucirica y Muguruza, 1997; MAPA, 1996). Recientemente se ha determinado que la enfermedad en España tiene su origen en EEUU (Bebegal *et al.*, 2013). En 2005 se confirmó la presencia de *F. circinatum* en un jardín privado de Francia sobre *P. menziesii* (EPPO, 2006). En Italia fue detectado en parques urbanos sobre *P. pinea* y *P. halepensis*

(Carlucci *et al.*, 2007). El último país donde se ha registrado la enfermedad en 2007 ha sido Portugal, detectándose *F. circinatum* en viveros causando daños en plantas de *P. radiata* y *P. pinaster* (Bragança *et al.*, 2002). Los últimos en sumarse a la lista de países con la enfermedad del CRP presente han sido Uruguay (Alonso y Bettucci, 2009), Colombia (Steenkamp *et al.*, 2012) y Brasil (Pfenning *et al.*, 2014). Aunque el CRP actualmente está ampliamente distribuido alrededor del mundo, existen países como Australia o Nueva Zelanda donde hay grandes plantaciones de *P. radiata*, que permanecen aún libres del patógeno.

En España la enfermedad del CRP queda limitada al norte peninsular afectando a plantaciones de *P. radiata* y *P. pinaster*, aunque en alguna ocasión se ha detectado y erradicado de algún vivero del centro del país, afectando a diferentes especies de pino. En la actualidad *F. circinatum* está presente en Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco, Navarra y Castilla y León (Figura 4). En Galicia el patógeno afecta principalmente a *P. pinaster*, mientras que en Cantabria, País Vasco y Navarra afecta exclusivamente a *P. radiata*. En Asturias se ha encontrado al patógeno en ambos hospedantes y en Castilla y León se encontró en plantaciones al norte de las provincias de León y Burgos, y en viveros forestales de Valladolid.

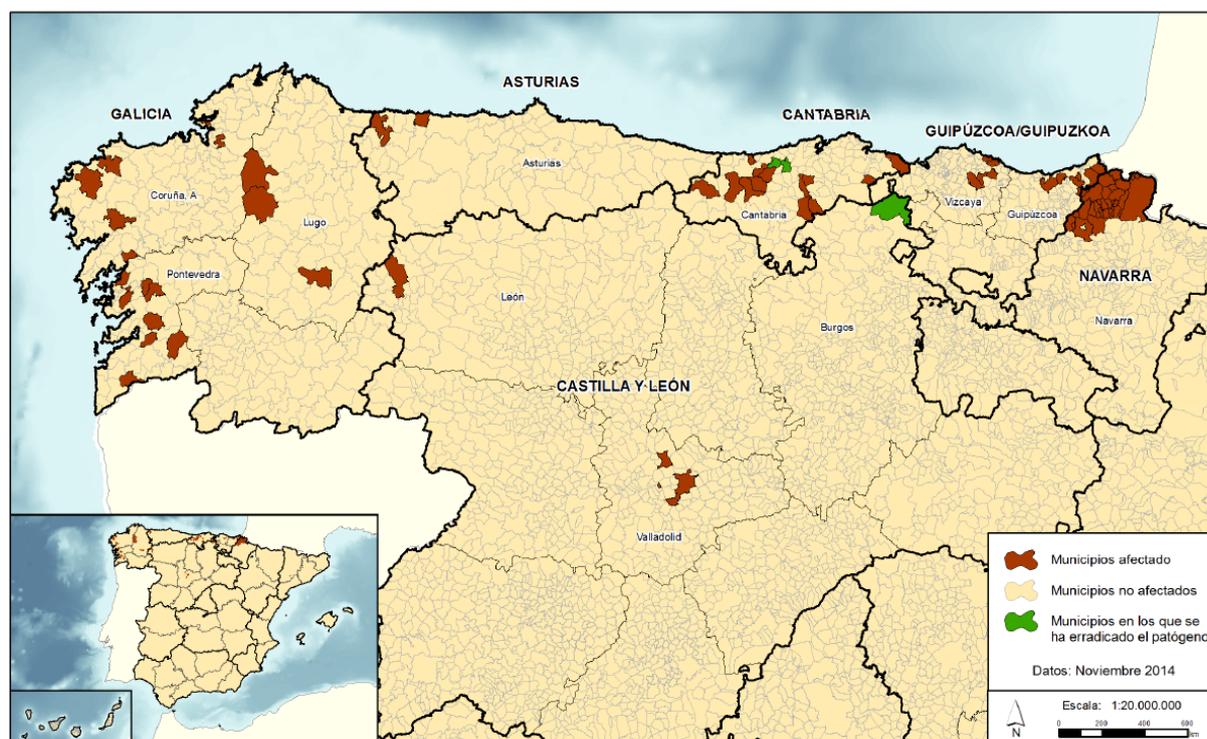


Figura 6. Distribución de la enfermedad del CRP en España. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Noviembre de 2014.

La diversidad de la población de este patógeno en España es muy reducida (Eugenia Iturrutxa *et al.*, 2011). El hecho de que sólo se hayan encontrado dos grupos diferentes de genotipos (Berbegal *et al.*, 2013) hace creer que *F. circinatum* fue introducido al menos dos veces en España. Los aislados que se detectaron en el primer vivero infectado en País Vasco en 1997 (Dwinell *et al.*, 1998), pertenecían al más común de los dos grupos de genotipos, el MLG32 (Berbegal *et al.*, 2013). Por lo tanto es probable que una de las introducciones tuviera lugar en el País Vasco y se

extendiera por el resto de las regiones del norte de España. El otro grupo de genotipos multilocus limitado al noroeste del país, está representado por el MELG59 (Berbegal *et al.*, 2013), siendo por lo tanto Galicia el segundo punto de origen de *F. circinatum* en España si se considera que pudo ser detectado en 1996 (MAPA, 1996).

Aunque es difícil saber cómo llegó el patógeno por primera vez a España, es probable que la fuente de entrada fueran semillas infectadas que fueron usadas para viveros (Berbegal *et al.*, 2013) y que pese al aspecto sano de las plantas, existiera una infección latente facilitando la dispersión del hongo (Wingfield *et al.*, 2008). Una vez en el campo, el patógeno pudo haberse transportado mediante esporas asexuales (microconidios o macroconidios) a través del viento (Correll *et al.*, 1991), de insectos (Storer *et al.*, 2004) o por contacto con herramientas de poda (Bezós *et al.*, 2012).

1.2. Descripción del hospedante. *Pinus radiata*.

Dentro de las especies susceptibles al CRP, hay 57 especies de *Pinus* (Enebak y Stanosz, 2003; Enebak y Carey, 2003; Guerra-Santos, 1998; Hepting y Roth, 1953; Hodge y Dvorak, 2000; Storer *et al.*, 1994; Storer *et al.*, 1997; Muramoto *et al.* 1993; Clark y Gordon 1999) y *P. menziesii*, el único hospedante registrado que no pertenece al género *Pinus* sp. (Gordon *et al.*, 2006). Según los estudios realizados, todo indica que *P. radiata* es el más susceptible de todos los pinos (Gordon *et al.*, 2001; Hodge y Dvorak, 2000). Se han hecho pruebas de susceptibilidad a *F. circinatum* con otras especies de árboles así como herbáceas, encontrándose en todas ellas una alta resistencia al patógeno (McCain *et al.*, 1987). Por lo tanto, se hace evidente que *F. circinatum* es exclusivamente un agente patógeno de coníferas y más concretamente del género *Pinus*.

Pese a que los hospedantes potenciales de *F. circinatum* son la mayoría de las especies del género *Pinus*, se ha descrito en algunas cierta resistencia y diferencias cuantitativas en susceptibilidad (Rockwood *et al.* 1988; Hodge y Dvorak, 2007; Viljoen *et al.*, 1995). Por ejemplo, *P. brutia* Ten. así como otras especies, especialmente las de la sección *Pinaster*, parecen tener altos niveles de resistencia a la enfermedad (Gordon *et al.*, 1998; Hodge y Dvorak, 2000; Mead, 2000). En otras especies, como por ejemplo *P. lambertiana* Douglas y *P. jeffreyi* Balf., se ha comprobado la susceptibilidad al patógeno mediante experimentos en invernadero, pero no en campo (Storer *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios referentes a otras especies de pino, han reflejado que los niveles de susceptibilidad en invernadero están correlacionados con la incidencia observada de la enfermedad en campo. Por lo tanto, con el suficiente tiempo de exposición al patógeno, se podría esperar que las especies susceptibles muestren niveles equivalentes de infección en campo (Gordon *et al.* 1998). Además, con frecuencia las especies consideradas como resistentes desarrollan una alta incidencia de la enfermedad bajo condiciones de estrés ambiental (Blakeslee y Rockwood 1999; Lopez-Zamora *et al.*, 2007). En este sentido, estudios recientes indican que la variación intraespecífica en la susceptibilidad implica que la selección de procedencia puede permitir la mejora de la resistencia en especies susceptibles a la enfermedad (Iturrutxa *et al.*, 2012, 2013). Por lo tanto, la relativa resistencia que presentan distintas especies de *Pinus* depende de factores genéticos y ambientales.

Se ha comprobado que en todas las especies de pino estudiadas, existía resistencia genética a la enfermedad (Kelley y Williams 1982; Hodge y Dvorak, 2000; Viljoen *et al.*, 1995), encontrándose diferencias entre las diferentes especies de pinos del sureste de EEUU (Dwinell y Barrows-Broaddus 1979; Bronson *et al.* 1992; Blakeslee y Rockwood 1999), California (Storer *et al.*, 1999), México y América Central (Hodge y Dvorak, 2007). En el caso del *P. radiata* se comprobó la heredabilidad de la resistencia al CRP en un estudio que incluyó material de programas de mejora en Australia, Chile y Nueva Zelanda (Matheson *et al.*, 2006). Por otro lado, en otro trabajo (Blakeslee y Rockwood, 1999), se encontraron diferencias en la resistencia a *F. circinatum*, en los programas de mejora de *P. elliotii* y de *P. taeda*. Se seleccionaron las familias de *P. elliotii* y *P. taeda* en las que la resistencia persiste en condiciones ambientales adversas, empleándose en plantaciones y programas de mejora genética, así como en la investigación sobre mecanismos de resistencia en el sureste de EEUU (Blakeslee y Rockwood 1999). En estas especies de pino, se investigó la regulación de loci específicos, alelos y genes asociados con rasgos de resistencia contra el CRP (Kayihan *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2004).

En 1988, se vio que algunos pies de *P. radiata* en California no se veían afectados por el CRP, a pesar de su proximidad a árboles afectados. Se llevaron a cabo inoculaciones directas sobre estos árboles asintomáticos, mostrando una menor tasa de crecimiento de la lesión que en árboles susceptibles (Correll *et al.*, 1991). En estudios posteriores, se observó que aunque la mayoría de los individuos de *P. radiata* son susceptibles al CRP (Storer *et al.*, 2002), un pequeño porcentaje de los árboles presentaba resistencia a la enfermedad (Gordon *et al.*, 1998; Storer *et al.*, 1999). Aunque la resistencia puede ser detectada relativamente pronto en ensayos de vivero (en árboles < 2 años), en estos casos la resistencia parece no ser funcional (Aegerter y Gordon, 2006). Además de la resistencia genética innata, se detectó resistencia sistemática inducida (SIR) en *P. radiata* en California (Bonello *et al.*, 2001; Storer *et al.*, 1999). Parece ser que la resistencia inducida en *P. radiata* es un componente crítico de la remisión de la enfermedad, en las zonas de California donde el CRP fue observado inicialmente (Gordon, 2006). Por lo tanto, la resistencia sistemática inducida puede ayudar a minimizar el daño en los bosques nativos de *P. radiata* y asegurar la vitalidad de este recurso natural.

Como ya se ha dicho anteriormente, *P. radiata* es la especie de pino más plantada en el mundo (Critchfield y Elbert, 1966), siendo Chile el país con mayor superficie plantada de ésta especie (Fernández y Sarmiento, 2004), con más de 1.500.000 ha (78% de la superficie reforestada del país). Además de Chile, otros países como Argentina, Uruguay, Sudáfrica, Australia o Nueva Zelanda poseen grandes plantaciones de *P. radiata* (Fernández y Sarmiento, 2004). En el caso de estos dos últimos países, el patógeno aún permanece ausente pero una posible aparición de éste podría conllevar serios problemas económicos, ecológicos y sociales, debido a la importancia que en ellos tiene este pino. En España las plantaciones de este pino son superiores a 250.000 ha (Ruiz de la Torre, 2006), una superficie pequeña en comparación con las especies autóctonas (en torno a un 3,6% del total de la superficie ocupada por coníferas), pero que sin embargo su producción supone un 25% de la madera de conífera (Hermoso *et al.*, 2007).

En la actualidad, algunas regiones de España han dejado de plantar *P. radiata* desde que fuera detectado *F. circinatum* (Landeras *et al.*, 2005), debido a la prohibición para usar *Pinus* spp. y *P. menziesii* en las zonas afectadas por el patógeno (MAPA, 2006). También ha descendido la producción de planta de *P. radiata* en vivero por el riesgo de contaminación y pérdida de la producción.

1.3. Estrategias de control de la enfermedad.

Hasta el momento no se ha encontrado ningún modo de controlar la enfermedad del CRP, tanto en vivero como en árboles adultos. Se han realizado algunos experimentos para analizar los efectos de diferentes fungicidas sobre *F. circinatum* (Mitchell *et al.*, 2004; Runion *et al.*, 1993). Los pobres resultados de estos estudios junto con la creciente concienciación del peligro que suponen los fungicidas para el medio ambiente, en especial en los bosques, corroboran el desarrollo de nuevos métodos de control alternativos como una posible solución efectiva. Por ejemplo, recientemente se comprobó el efecto del uso de agua caliente en semillas de pino sobre la supervivencia de *F. circinatum* (Agustí-Brisach *et al.*, 2012; Berbegal *et al.*, 2015), comprobándose que el tratamiento con agua caliente a 51-52 °C durante 30 minutos sobre semillas de *P. radiata*, podía reducir la contaminación del patógeno. Del mismo modo, se encontró al peróxido de hidrógeno como un buen desinfectante para las semillas frente al patógeno (Berbegal *et al.*, 2015; Dwinell y Fraedrich, 1999). Pese a todo, aunque estos métodos han conseguido reducir el número de semillas infectadas, resultan insuficientes para evitar la introducción de planta contaminada en el monte. Para reducir el impacto de esta enfermedad, es necesario un enfoque de gestión integrada. En él, el uso de métodos de control biológico, que han mostrado buenos resultados de frente a otras enfermedades causadas por hongos, resulta imprescindible debido a la necesidad de eliminar el uso de productos químicos de los bosques y viveros.

Se entiende por control biológico como la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad de la enfermedad producida por un patógeno mediante uno o más organismos distintos del hombre (Cook y Baker, 1983). Estos organismos a su vez pueden ser: (1) cepas no virulentas o hipovirulentas del patógeno, (2) plantas huésped manipuladas ya sea genéticamente, por prácticas culturales o mediante microorganismos hacia una mayor o mejor eficacia en la resistencia al patógeno, y (3) antagonistas del patógeno, es decir microorganismos que interfieren en la supervivencia del patógeno o en las actividades de éste que provocan enfermedades.

Son muchas las ventajas que ofrece el control biológico aplicado a enfermedades de plantas frente al uso de productos químicos. El uso de fungicidas o bactericidas termina por provocar la aparición de cepas de patógenos resistentes a éstos (Dekker y Georgopoulos, 1982). Además el efecto en la mayoría de los productos químicos son no específicos y de amplio espectro, pudiendo producir efectos no deseados en otros organismos, que tal vez podrían jugar un papel importante como antagonistas (Spokes *et al.*, 1981). También pueden resultar perjudiciales para los seres humanos, especialmente al emplearse en agricultura, pudiendo pasar a formar parte de la cadena trófica (Kniewald, 2003). Una ventaja más es el control a largo plazo que se consigue con el control biológico, ya que los Agentes de Control Biológico (BCA's) actúan continuamente de manera específica y actuando constantemente sobre el patógeno en cuestión. Por lo tanto, aunque puede resultar económicamente caro su introducción debido a los costes de investigación, a largo

plazo puede resultar bastante económico (Cook y Baker, 1983). Debido al uso cada vez más restringido de productos químicos en campo, adquieren mayor importancia los métodos de control biológico (European Commission (EC), 2009).

Uno de los métodos más efectivos para el control biológico de ciertas enfermedades de plantas, es el empleo de micovirus. El uso de éstos como controladores de enfermedades puede resultar un método prometedor, siempre y cuando la diversidad de las poblaciones del patógeno sea baja, como por ejemplo cuando aún es reciente la introducción del hongo en la región o cuando hay ausencia de reproducción sexual, como sucede en España (Berbegal *et al.*, 2013). Sin embargo todavía queda un largo camino por recorrer en el desarrollo de una herramienta de control biológico utilizando micovirus, ya que requiere encontrar primero un virus que produzca hipovirulencia y luego conocer las limitaciones en su transmisión.

Otra de las posibilidades de control biológico, consiste en el empleo de hongos endófitos como BCA's, organismos que habitan en órganos de las plantas y que pueden en cualquier momento de su vida, colonizar tejidos vegetales sin causar aparentes daños a sus hospedante (Petrini, 1991). Estas interacciones entre hongos fitopatógenos y hongos endófitos, son conocidas desde principios de siglo XX (Weindling, 1932), siendo ya desde entonces objeto de estudio el uso de hongos endófitos como BCA's (Mehrotra *et al.*, 1988; Yang y Laflamme, 1995). Actualmente se sabe que los tejidos vegetales que contienen hongos endófitos (Petrini y Fisher, 1988) afectan a la resistencia de sus hospedantes frente a parásitos (Miller, 1986). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que las plantas inoculadas con endófitos incrementan su crecimiento (Barka *et al.*, 2002), mejoran la resistencia a la sequía (Swarthout *et al.*, 2009), toleran mejor condiciones de suelos no aptos (Malinowski *et al.*, 2005), tienen mayor acceso a nutrientes (White *et al.*, 1997), y mejoran la defensa frente animales herbívoros (Carroll, 1988) y patógenos (Arnold *et al.*, 2003). Este último beneficio, la mejor defensa frente a patógenos, puede a su vez diferenciarse y agruparse en: efectos directos, indirectos y ecológicos (Gao *et al.*, 2010). En los efectos directos, los endófitos suprimen directamente al patógeno mediante la producción de antibióticos (Richardson *et al.*, 2014) o la secreción de enzimas líticas (Tripathi *et al.*, 2008). Por otro lado, los efectos indirectos que los endófitos provocan en las plantas, ayudando así a reducir el daño del patógeno pueden ser por ejemplo, la inducción de resistencia a la planta, la estimulación de metabolitos secundarios y el incremento del crecimiento y de la actividad fisiológica. Por último, ejemplos de efectos ecológicos son la ocupación de un nicho ecológico, el hiperparasitismo y la depredación (Gao *et al.*, 2010).

Uno de los endófitos más estudiados por su potencial como BCA en enfermedades de plantas es el género *Trichoderma* (Howell, 2003). Una de las características más destacadas que presenta este grupo, es su habilidad para parasitar otros hongos (Weindling, 1932), pero además son capaces de producir sustancias antibióticas que son inhibitoras de muchos patógenos (Howell y Stipanovic, 1983). Sin embargo, el principal mecanismo de control biológico de *Trichoderma* spp. es la competencia por el espacio y nutrientes de la rizosfera (Howell, 2003). El crecimiento de este hongo no está limitado al suelo o a las raíces, si no que es capaz de colonizar el floema e incluso la albura de los árboles (Jankowiak, 2006). Existen muchos ejemplos del éxito de *Trichoderma* spp. como controlador de enfermedades de plantas (Abdullah *et al.*, 2008; Latunde-Dada, 1993; Ruano-Rosa *et al.*, 2010),

siendo en alguno de los casos enfermedades causadas por patógenos del género *Fusarium* (Basak y Basak, 2011; Bernal-Vicente *et al.*, 2009; Sivan *et al.*, 1987).

Hasta el momento ha sido muy poco lo que se ha investigado para reducir el impacto del patógeno de la enfermedad del CRP mediante el uso de hongos endófitos. Por un lado se ha observado la interacción antagonista entre *F. circinatum* y las especies fúngicas *Penicillium chrysogenum* Link. and *Fusarium lateritium* Ness. (Romón *et al.*, 2008). De manera similar, se comprobó el antagonismo al patógeno del CRP de dos bacterias endófitas (*Bacillus subtilis* Cohn y *Burkholderia* sp.) (Soria *et al.*, 2012). Por último también se evaluó el uso potencial de cepas de *Trichoderma* spp. y *Clonostachys* spp. como controladores de *F. circinatum* en plantas de *P. radiata* (Moraga-Suazo *et al.*, 2011). Se observó un incremento significativo de la supervivencia de las plantas de *P. radiata* con una de las cepas de *Clonostachys* spp. probadas, no siendo así en el caso de los aislamientos de *Trichoderma* spp. Se alcanzaron las mismas conclusiones en los estudios previos en los que se ensayó con *Trichoderma* spp. como BCA de la enfermedad (Dumroese *et al.*, 1988; Mitchell *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

2. Objetivos.

La enfermedad del Chancro Resinoso del Pino (CRP), causada por el hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (Nirenberg y O'Donnell, 1998), es un serio problema en países como Estados Unidos, México, Colombia, Brasil, Chile, Uruguay, Haití, Sudáfrica, Japón, Corea, Francia, Italia, Portugal o España, y amenaza potencialmente con introducirse en Australia y Nueva Zelanda. La enfermedad se desarrolla con gran virulencia en las especies del género *Pinus*, siendo la más susceptible dentro de este grupo *Pinus radiata*. Los daños que el hongo causa sobre este hospedante revisten gran gravedad, lo que unido a la cantidad de plantaciones dedicadas a esta especie forestal en el Norte de la Península Ibérica hace necesario el avance en técnicas de control de la enfermedad, siendo las de control biológico una de las más inocuas en detrimento del control químico, cuyos efectos son peligrosos tanto para el medio ambiente como para la salud. En esta línea, los hongos endófitos tienen un papel destacado en el equilibrio de los sistemas patológicos y por tanto también en el desarrollo de las enfermedades (Martínez Álvarez *et al.*, 2009).

La efectividad de los hongos endófitos en el control biológico del CRP, ha sido postulada en diversos trabajos (Dumroese *et al.* 1988, Mitchell *et al.* 2004, Romón *et al.*, 2008; Bernal-Vicente *et al.* 2009; López-Mondéjar *et al.* 2010; Moraga-Suazo *et al.*, 2011; Martínez-Álvarez, 2011; Soria *et al.*, 2012), centrados mayormente en el género *Trichoderma* sp. El objetivo general del presente trabajo es evaluar el efecto de diversos endófitos previamente seleccionados en el laboratorio en un ensayo previo realizado *in vitro* en el que se probaron un total de 546 hongos endófitos (Martínez Álvarez *et al.*, 2015) como posibles BCA's.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

1. Comprobar el efecto de la especie de pino sobre la patogenicidad de *F. circinatum*.
2. Comprobar el efecto de los hongos endófitos sobre las especies de pino utilizadas.
3. Determinar el potencial de seis hongos endófitos como controladores biológicos de la enfermedad del CRP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

3. Material y Métodos.

3.1. Zona de estudio.

El ensayo se realizó en una parcela de 3,41 ha de superficie, situada en el término municipal de Rionansa, en el extremo occidental de Cantabria (Figura 7) y cedida por la Dirección General de Montes del Gobierno de Cantabria. Las características climáticas de la zona de estudio se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 8 el climodiagrama.

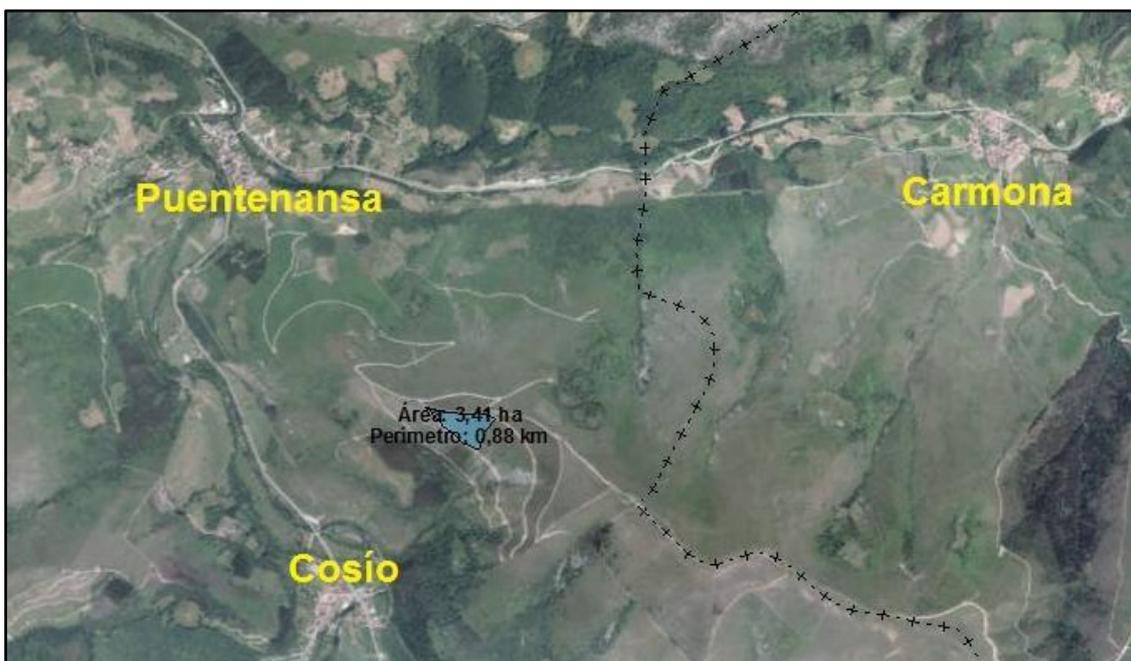


Figura 7. Ortofoto de la parcela de ensayo. Fuente: <http://mapas.cantabria.es/> (modificado).

Tabla 1. Características de la parcela de ensayo. Coordenadas para el Huso UTM 30, Datum ETRS 89. Fuente: Atlas Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola *et al.*, 2005).

Coord. X (UTM)	386979
Coord. Y (UTM)	4788566
Localidad	Puentenansa
Municipio	Rionansa
Altitud (m)	525-615
Orientación	Suroeste
Pendiente (%)	50
Precipitación Anual (mm)	1092
Temperatura media (°C)	11
Temperatura mínima media (°C)	5
Temperatura máxima media (°C)	17

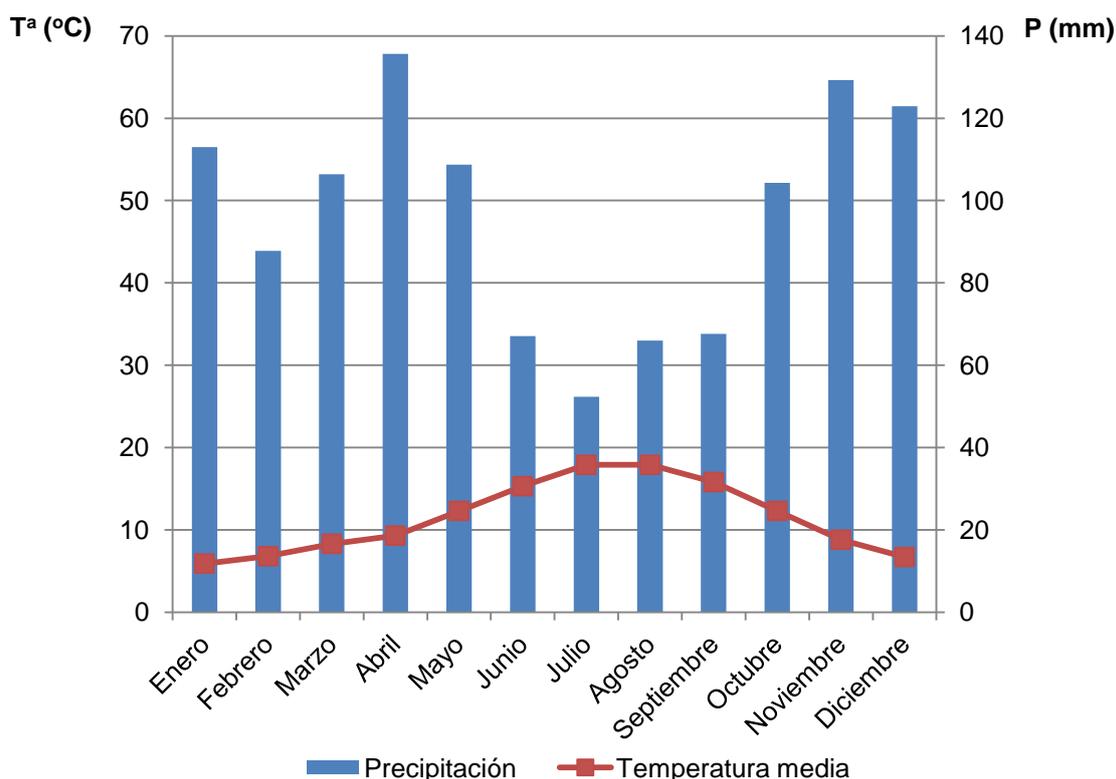


Figura 8. Climodiagrama de la zona donde se ubica la parcela de ensayo. La precipitación máxima se da en el mes de abril (135,6 mm) y la mínima en el mes de julio (52,3 mm). La temperatura media anual es de 11 °C. Como se puede ver, no hay período de estación seca. Datos climáticos obtenidos del Atlas Climático Digital de la Península Ibérica (Ninyerola *et al.*, 2005).

Se trata de una parcela con orientación suroeste y fuerte pendiente (50%), en la que anteriormente existió una plantación de *P. radiata*, al menos hasta el año 2002. Posteriormente se llevó a cabo una repoblación con frondosas (*Quercus rubra* L. entre otras) y alguna conífera (*Picea* sp.). En ambos casos, se produjeron incendios que terminaron por truncar su desarrollo. La vegetación que encontramos en la zona de ensayo, es la propia de las zonas de la Cornisa Cantábrica en las que como consecuencia de la acción continua de incendios no existe arbolado, lo cual da pie a una comunidad vegetal compuesta principalmente por tojo o escajo (*Ulex europaeus*), distintos brezos (principalmente *Erica mackaiana*), *Daboecia cantabrica* o *Calluna vulgaris*.

3.2. Material fúngico.

3.2.1. Aislados de *Fusarium circinatum*.

La cepa de *F. circinatum* seleccionada para este ensayo fue obtenida del xilema de un ejemplar de *P. radiata* afectado por la enfermedad del chancro resinoso del pino (CRP), recogido con anterioridad a la realización del ensayo en una plantación muy cercana a la ubicación del experimento (Figura 9). El motivo de la utilización de este aislamiento fue evitar la introducción de nuevas cepas del patógeno en la zona, lo que complicaría el posterior manejo de la enfermedad al aumentar la diversidad genética en la población del hongo.



Figura 9. Distribución de las zonas declaradas con *F. circinatum* en Cantabria. Tanto la zona de estudio, como la cepa seleccionada del patógeno que se utilizó, se localizan en la Zona 7 dentro del término municipal de Rionansa(en rojo).

Una vez las muestras de material vegetal estuvieron en el laboratorio, se procedió a aislar al patógeno *F. circinatum* para poder cultivarla *in vitro*. Las muestras se desinfectaron superficialmente para asegurarnos que los hongos obtenidos procedían del interior de los tejidos hospedantes. Para ello, primero se lavaron con agua y a continuación se esterilizaron por inmersión siguiendo este orden: etanol al 70% (durante 1 minuto), hipoclorito sódico al 3% (1 minuto) y agua destilada estéril (1 minuto). Después se colocaron las muestras sobre papel de filtro estéril para que secasen, se cortaron en trozos más pequeños y se cultivaron en un medio Patata-Dextrosa-Agar con 0,5 g/l de sulfato de estreptomicina (PDAs) para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes (Figura 10).

Para identificar las especies fúngicas obtenidas tras el cultivo de las muestras en el medio de cultivo, estas fueron transferidas a medio de cultivo SNA (Spezieller Nährstoffmarmor Agar), adecuado para la identificación morfológica de las especies del género *Fusarium*. La producción de estructuras típicas del hongo tales como mono y polifialidas, macroconidios triseptados, circinos (hifas estériles enrolladas), así como la ausencia de clamidosporas y cadenas de conidios, nos permitió determinar que el aislamiento pertenecía a la especie *F. circinatum*. Aun así, para confirmar esta identificación, también se utilizaron técnicas moleculares. Para ello, el ADN del aislamiento se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Vainio et al, (1998). Posteriormente, este ADN se amplificó mediante la técnica de la PCR utilizando los cebadores específicos para *F. circinatum* CIRC1A (5'-CTTGGCTCGAGAAGGG-3') y CIRC4A (5'-ACCTACCCTACACCTCTCACT-3') diseñados por Schweigkofler et al. (2004). El programa del termociclador para la amplificación consistió en un paso inicial de 3 minutos a 94°C seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 35 segundos, anillamiento a 64°C durante 55 segundos y elongación a 72°C durante 50 segundos. Para finalizar se realizó una extensión final a 72°C durante 50 segundos.

Para comprobar el mating type al que pertenecía el aislamiento, de nuevo utilizamos la técnica de la PCR para amplificar parte del ADN, en este caso usando las parejas de cebadores GcHMG1, GcHMG2 y MAT1p2, MAT1p3 descritos por Wallace y Covert (2000) y Schweigkofler et al. (2004). En este caso la desnaturalización inicial fue realizada a 93°C durante 5 min, a la que le siguieron 35 ciclos con las temperaturas y tiempos que aparecen a continuación: 93°C, 45 s; 45°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 s. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. El ADN amplificado se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante una hora en tampón TAE al 1% y a 3 V/cm. Tras la electroforesis, el gel fue teñido con GelRed™ (Biotium) y observado bajo luz ultravioleta. El marcador utilizado para estimar el tamaño de los productos amplificados fue λ -DNA Hind III – Φ X174Hae III (DyNA-zyme™ DNA Polymerase Kit).



Figura 10. Proceso de desinfección superficial de la muestra vegetal (etanol 70%, hipoclorito sódico 3%, agua esterilizada) y posterior cultivo en PDAs.

Por último, una vez confirmada la identidad del aislamiento se preparó una disolución de esporas de *F. circinatum* que después se usaría para inocular el patógeno en las plantas de la parcela de ensayo. Sirviéndonos de un hemocitómetro y con la ayuda de un microscopio, se consiguió obtener una disolución de esporas de concentración 10^6 esporas/ml.

3.2.2. Hongos endófitos ensayados.

En este ensayo fueron empleados seis hongos endófitos, seleccionados por presentar un especial interés como posibles Agentes de Control Biológico (BCA's) tras los resultados obtenidos en un ensayo previo realizado *in vitro* en el que se probaron un total de 546 hongos endófitos (Martínez Álvarez *et al.*, 2015).

Los seis endófitos que se emplearon en el ensayo *in vivo* fueron: HP031 (*Trichoderma spirale* Bissett), HP047 (*Chaetomium aureum* Chivers), HP066 (*Alternaria* sp.), HP143 (*Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg), HP151 (*Trichoderma atroviride* P. Karst.) y HP155 (*Trichoderma viride* Pers.). La identificación de estos endófitos se realizó con anterioridad a este ensayo mediante técnicas moleculares.

3.3. Especies de pino ensayadas.

En la parcela de ensayo se plantaron cinco especies distintas de pino: *P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinaster*, *P. pinea*. Se utilizaron 1500 plantas, 300 de cada especie distribuidas en tres bloques, teniendo así tres repeticiones de cada especie, 100 plantas por repetición (Figura 11).

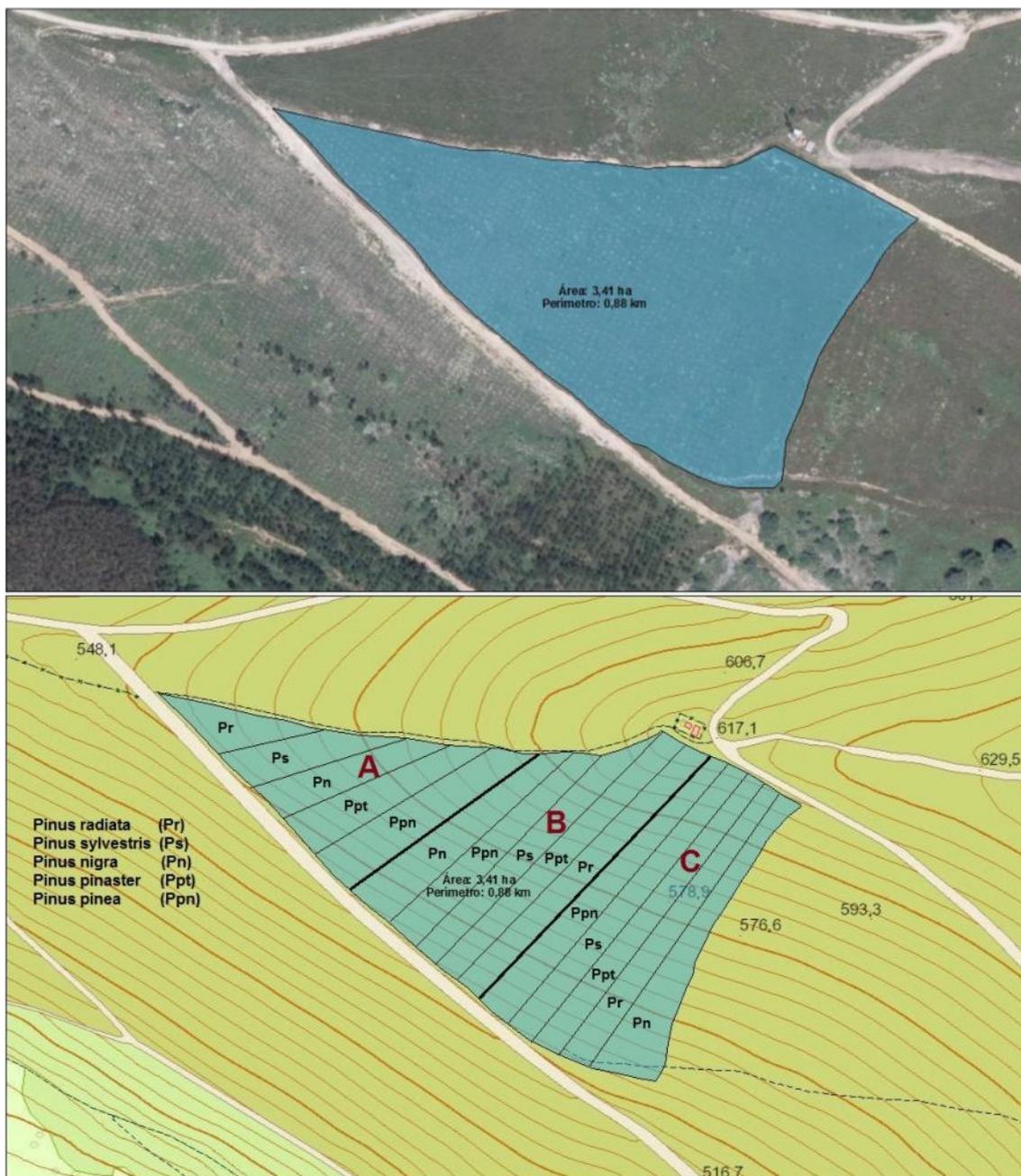


Figura 11. Ortofoto de la parcela de ensayo (imagen superior) y replanteo de la distribución de los bloques. Fuente: <http://mapas.cantabria.es/> (modificado).

Para estudiar el efecto de los hongos endófitos seleccionados frente al patógeno *F. circinatum* sobre las 5 especies de pino, se realizó la plantación de un total de 1500 plantas de pino de dos savias en junio de 2012. Al comienzo del ensayo, en abril de 2013 y al final del mismo en julio de 2014, se tomaron medidas del diámetro en el cuello de la raíz, altura total y altura en la base de la copa viva en todas las plantas.

3.4. Inoculación de las plantas con los aislados fúngicos.

La inoculación de las plantas de pino se llevó a cabo en dos fases. La primera se realizó entre los días 22 y 26 de julio de 2013, y en ella se inocularon los hongos endófitos seleccionados. Para inocular los endófitos en las plantas de la parcela de ensayo, se procedió a realizar un corte en el tallo de la planta a unos 5 cm del suelo y colocar un trozo de agar de unos 16 mm² con micelio del endófito, siendo seguidamente sellada la herida con una banda de Parafilm® (Figura 12). En el tratamiento control se utilizó un bloque de agar estéril de las mismas dimensiones.



Figura 12. Proceso de inoculación del endófito en la planta del ensayo. De arriba a abajo: corte en el tallo, inoculación con un trozo de micelio cultivado sobre PDA y sellado del corte con Parafilm®.

Cinco semanas después de la inoculación de los endófitos, entre los días 2 y 5 de septiembre de 2013, se realizó la del patógeno *F. circinatum*. El procedimiento para inocular el patógeno fue similar al de la inoculación de los endófitos, pero en este caso se inculó con 10 μ l de disolución de esporas (Figura 13). En el tratamiento control en vez de los 10 μ l de la disolución de esporas se utilizaron 10 μ l de agua destilada estéril. La inoculación del patógeno se realizó dos centímetros por debajo de la zona de inoculación del endófito, de acuerdo con ensayos de inoculación anteriores (Romeralo *et al.*, 2015).



Figura 13. Proceso de inoculación del patógeno en la planta, inoculado previamente con el endófito. De arriba a abajo: corte en el tallo e inoculación con una disolución de esporas.

En la parcela de ensayo se hicieron por lo tanto un total de 14 tratamientos diferentes, resultado de enfrentar los 6 endófitos con el patógeno más los controles (sólo los endófitos, sólo el patógeno y ninguno de los dos hongos).

3.5. Evaluación del efecto antagonista.

Con el fin de evaluar los daños que el patógeno podría producir en las plantas, se realizaron cuatro visitas a la parcela de ensayo (diciembre de 2013, marzo, mayo y julio de 2014). Con este objetivo se anotaron por cada planta los síntomas de la enfermedad siguiendo la metodología descrita por Correll *et al.* (1991), en el que cada inoculación se evaluó siguiendo una escala de daño de 0 (planta sana), 1 (follaje sano, necrosis en el punto de inoculación), 2 (follaje sano, necrosis >2 cm más allá del punto de inoculación), 3 (acículas/ramillas marchitas y necrosis anillando el tallo) y 4 (planta muerta). El área debajo de la curva de la enfermedad (AUDPC) se calculó mediante la suma de los trapecios que se formaron al representar la escala de daños en el eje de ordenadas frente al tiempo en el eje de abscisas (Figura 14).

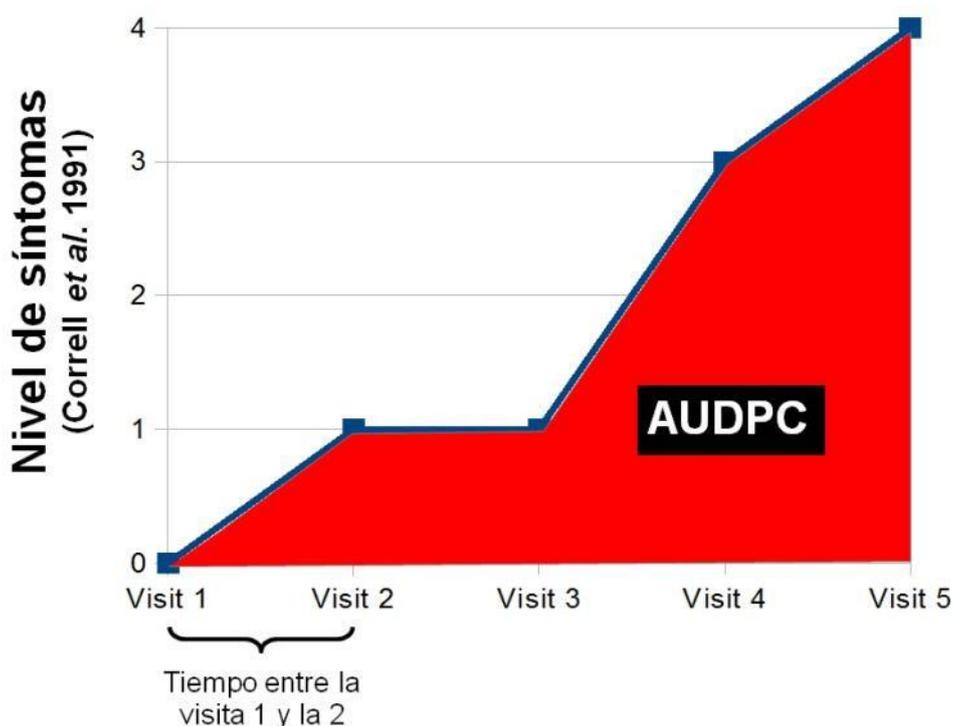


Figura 14. Gráfica del área debajo de la curva de la enfermedad (AUDPC) que se empleó para evaluar los daños.

3.6. Análisis estadístico.

Para analizar los datos, se empleó un modelo lineal mixto de análisis de varianza con tres factores en un diseño de parcelas divididas. Para el conjunto de la parcela, con un diseño de tres bloques divididos en filas al azar, se utilizó el factor "especies de pino" con cinco niveles distintos. Para las filas, con un diseño factorial dentro de cada bloque, se usó el factor "*F. circinatum*" con dos niveles (sí o no) y el factor "endófito" con siete niveles. Para resolver el problema de la alta heterogeneidad de varianzas debido a los factores "especies de pino" y "*F. circinatum*", se utilizaron diferentes variaciones aleatorias para cada una de las diez combinaciones de estos dos factores. Se utilizó el Test LSD de Fisher para las comparaciones de las medias. La fórmula matemática del modelo fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \omega_{ij} + \gamma_k + \delta_l + \gamma\delta_{kl} + \alpha\gamma_{ik} + \alpha\delta_{il} + \alpha\gamma\delta_{ikl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde $i = 1, \dots, 5$ para "especies de pino", $j = 1, 2, 3$ para los bloques, $k = 1, 2$, para los niveles del factor "*F. circinatum*" y $l = 1, \dots, 7$ para los niveles del factor "endófito" y siendo Y_{ijkl} = el valor observado de la variable dependiente para la fila con el nivel k de "*F. circinatum*", y el nivel l de "endófito" en la fila con "especies de pino" i en el bloque j ; μ = efecto medio general; α_i = efecto principal de las especies de pino i ; β_j = efecto principal del bloque j ; γ_k = efecto principal del nivel k del factor "*F. circinatum*"; δ_l = efecto principal del nivel l del factor "endófito"; $\gamma\delta_{kl}$ = efecto de interacción entre el nivel k del factor "*F. circinatum*" y el nivel l del factor "endófito"; $\alpha\gamma_{ik}$ = efecto de interacción entre las especies de pino i y el nivel k del factor "*F. circinatum*"; $\alpha\delta_{il}$ = efecto de interacción entre las especies de pino i y el nivel l del factor "endófito"; $\alpha\gamma\delta_{ikl}$ = efecto de interacción triple de las especies de pino i y el nivel k del factor "*F. circinatum*" y nivel l del factor "endófitos"; y ε_{ijkl} = error aleatorio en la variable dependiente para la fila con el nivel k de "*F. circinatum*", y el nivel l de "endófito" en la fila con "especies de pino" i en el bloque j . Los supuestos para el modelo fueron: $\omega_{ij} \sim N(0, \theta^2)$, con θ^2 = varianza aleatoria para el error de la parcela; $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma_{il}^2)$, con σ_{il}^2 = varianza aleatoria para el error de fila con las "especies de pino" i y el "endófito" l ; y que todas las variables ω_{ij} y ε_{ijkl} sean independiente para cualquier valor de i, j, k, l . Por lo tanto, el modelo incluye once parámetros de varianza, calculándose usando el método de Máxima Verosimilitud Restringida (REML son sus siglas en inglés).

RESULTADOS

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

4. Resultados.

Mediante técnicas moleculares se confirmó que la cepa aislada en laboratorio pertenecía a la especie de *F. circinatum*, y al grupo de apareamiento mating type 2. El aislamiento se nombró como FcCa099.

4.1. Análisis de variables empleadas.

Los resultados del análisis de la varianza realizado para cada una de las 4 variables utilizadas (AUDPC, copa viva, altura total y diámetro en el cuello de la raíz) para evaluar el efecto antagonista de los hongos endófitos frente al patógeno *F. circinatum* en campo, se presentan en las Tablas 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

En el análisis de la varianza de la variable AUDPC, se observaron diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) entre las especies de pino ensayadas (especie pino) y entre los tratamientos con y sin *F. circinatum*. De la misma manera fueron significativas las interacciones dobles *F. circinatum* * endófito y especie pino * *F. circinatum*. Los efectos del bloque y los endófitos sobre la variable AUDPC no fueron significativos, al igual que tampoco lo fueron las interacciones especie pino * endófito y especie pino *F. circinatum* endófito (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla ANOVA para la variable AUDPC.

Efecto	Num DF	F-Valor	P-Valor
Especie pino	4	252,68	<,0001
Bloque	2	0,21	0,8154
<i>F. circinatum</i>	1	839,64	<,0001
Endófito	6	1,73	0,1194
<i>F. circinatum</i> * Endófito	6	2,36	0,0342
Especie pino * <i>F. circinatum</i>	4	280,88	<,0001
Especie pino * Endófito	24	1,27	0,1941
Especie pino * <i>F. circinatum</i> * Endófito	24	1,42	0,1099

Los resultados obtenidos tras el análisis de la varianza de la variable copa viva, mostraron que el efecto de la especie de pino y la presencia de *F. circinatum* fueron significativos (p -valor $< 0,05$). También lo fueron la interacción de los dos mencionados factores especie pino * *F. circinatum*. Por el contrario no fueron significativos, los efectos del bloque y ni del endófito, así como tampoco las interacciones *F. circinatum* * endófito, especie pino * endófito y especie pino * *F. circinatum* * endófito (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla ANOVA para la variable Copa Viva.

Efecto	Num DF	F-Valor	P-Valor
Especie pino	4	6,19	0,0143
Bloque	2	3,00	0,1064
<i>F. circinatum</i>	1	22,44	<,0001
Endófito	6	0,92	0,4854
<i>F. circinatum</i> * Endófito	6	0,50	0,8037
Especie pino * <i>F. circinatum</i>	4	8,80	<,0001
Especie pino * Endófito	24	0,95	0,5347
Especie pino * <i>F. circinatum</i> * Endófito	24	0,76	0,7756

En el caso de la variable altura total, se observaron diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) en los factores especie pino, bloque y *F. circinatum* y para la interacción especie pino * *F. circinatum*. Los efectos de los endófitos y las interacciones *F. circinatum* * endófito, Especie pino * endófito y especie pino * *F. circinatum* * endófito sobre la variable altura total, no fueron significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla ANOVA para la variable Altura Total.

Efecto	Num DF	F-Valor	P-Valor
Especie pino	4	11,93	0,0019
Bloque	2	6,44	0,0216
<i>F. circinatum</i>	1	12,21	0,0007
Endófito	6	0,55	0,7713
<i>F. circinatum</i> * Endófito	6	0,39	0,8837
Especie pino * <i>F. circinatum</i>	4	13,72	$<,0001$
Especie pino * Endófito	24	0,78	0,7562
Especie pino * <i>F. circinatum</i> * Endófito	24	0,59	0,9308

Por último, el análisis de la varianza realizado para la variable diámetro en el cuello de la raíz, encontró diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) para los efectos especie pino, bloque y *F. circinatum* y para la interacción especie pino * *F. circinatum*. Por el contrario el efecto de los endófitos y de las interacciones *F. circinatum* * endófito, especie * endófito y especie * *F. circinatum* * endófito, no resultaron significativos (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla ANOVA para la variable Diámetro en el Cuello de la Raíz.

Efecto	Num DF	F-Valor	P-Valor
Especie pino	4	12,54	0,0016
Bloque	2	50,32	$<,0001$
<i>F. circinatum</i>	1	5,99	0,0157
Endófito	6	1,11	0,3602
<i>F. circinatum</i> * Endófito	6	0,49	0,8149
Especie pino * <i>F. circinatum</i>	4	18,57	$<,0001$
Especie pino * Endófito	24	1,21	0,2464
Especie pino * <i>F. circinatum</i> * Endófito	24	1,01	0,4645

4.2. Susceptibilidad a *F. circinatum*.

El análisis de la varianza encontró diferencias significativas (p -valor $< 0,001$) entre el efecto causado por *F. circinatum* en las 5 especies de pino evaluadas. Analizando los tratamientos en los que únicamente el patógeno fue inoculado, *P. radiata* resultó ser la especie más susceptible de las cinco probadas. El valor de la variable AUDPC para esta especie, fue casi cinco veces mayor que en el caso de *P. sylvestris*, la segunda especie en susceptibilidad. Estas dos especies junto con *P. pinaster*, han de considerarse susceptibles al patógeno, ya que el valor de la variable AUDPC fue significativamente mayor en el tratamiento en que se inoculó *F. circinatum* (CF) que en el tratamiento control (CT). Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos para el caso de las especies *P. nigra* y *P. pinea*, por lo que no podemos considerarlas susceptibles a *F. circinatum* (Figura 15).

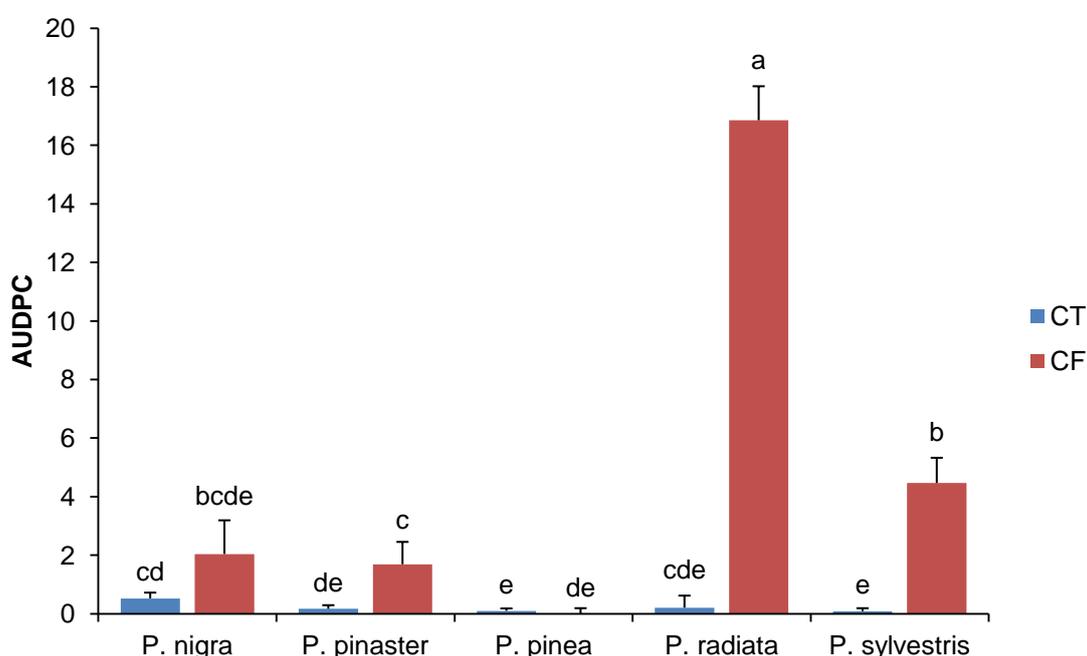


Figura 15. Valor de la variable AUDPC para las cinco especies de pino, inoculadas con *F. circinatum* (CF) o en el tratamiento control (CT). En ambos casos, las plantas no fueron inoculadas con ningún endófito. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-e), denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

A la vista del análisis de las variables dendrométricas, *F. circinatum* produjo una reducción significativa del crecimiento de las plantas de *P. radiata*. En el caso de la variable diámetro en el cuello de la raíz, en esta especie se produjo una reducción significativa del crecimiento de un 50,6% ($t = 8,84$, p -valor $< 0,001$). Las cuatro especies restantes de *Pinus*, no presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos (Figura 16).

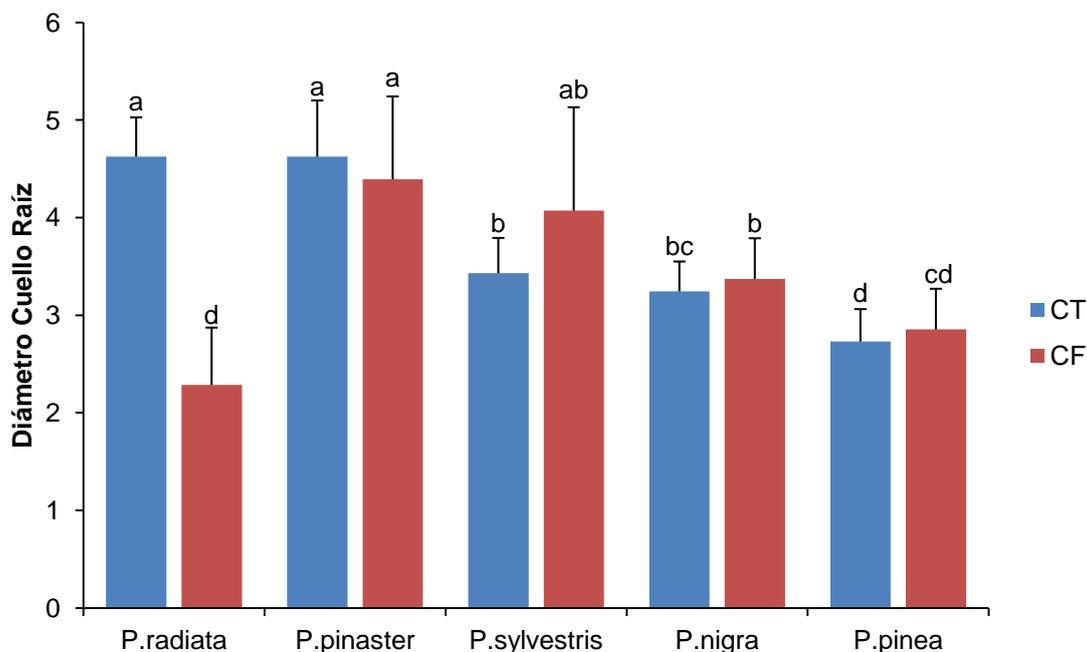


Figura 16. Crecimiento del diámetro en cuello de la raíz para las cinco especies de pino, inoculadas con *F. circinatum* (CF) o en el tratamiento control (CT). En ambos casos, las plantas no fueron inoculadas con ningún endófito. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-e), denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

En el caso de la variable altura total, sólo *P. radiata* presentó una reducción significativa del crecimiento de un 48,6% ($t = 8,30$, p -valor $< 0,001$). En el caso de las otras cuatro especies de *Pinus*, las diferencias entre los dos tratamientos no fueron significativas (Figura 17).

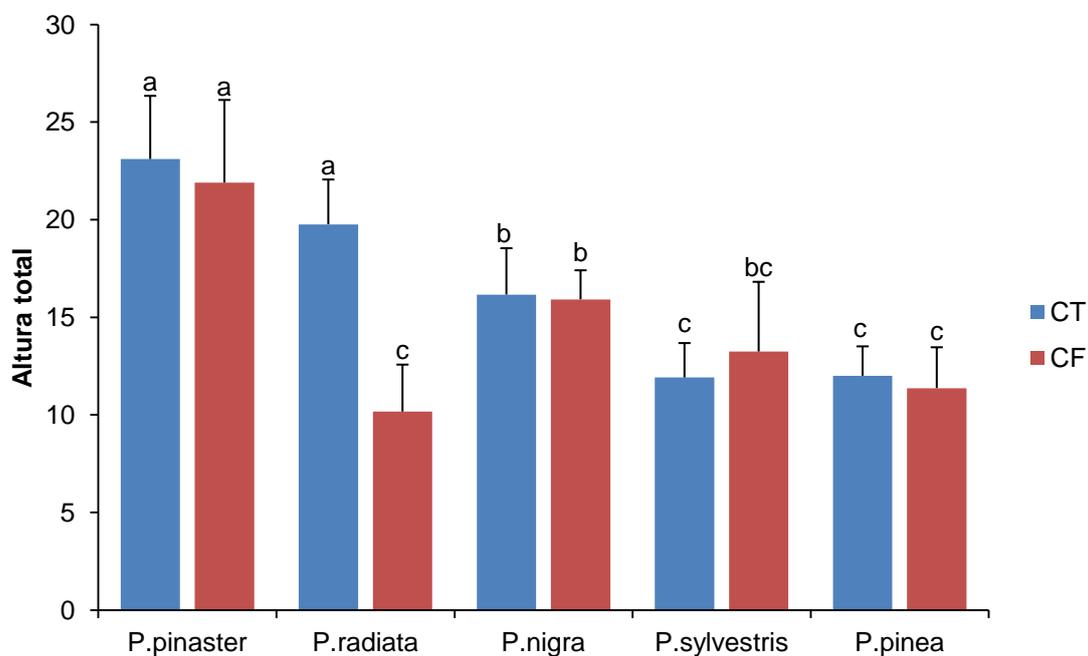


Figura 17. Crecimiento en altura total para las cinco especies de pino, inoculadas con *F. circinatum* (CF) o en el tratamiento control (CT). En ambos casos, las plantas no fueron inoculadas con ningún endófito. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-e), denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

Por último la reducción en crecimiento para la variable altura de la copa viva, también resultó significativa para *P. radiata* ($t = 6,54$, p -valor $< 0,001$), siendo un 58% menor con respecto a las plantas control (CT). Al igual que en los anteriores casos, las otras cuatro especies de *Pinus*, no mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos probados.(Figura 18).

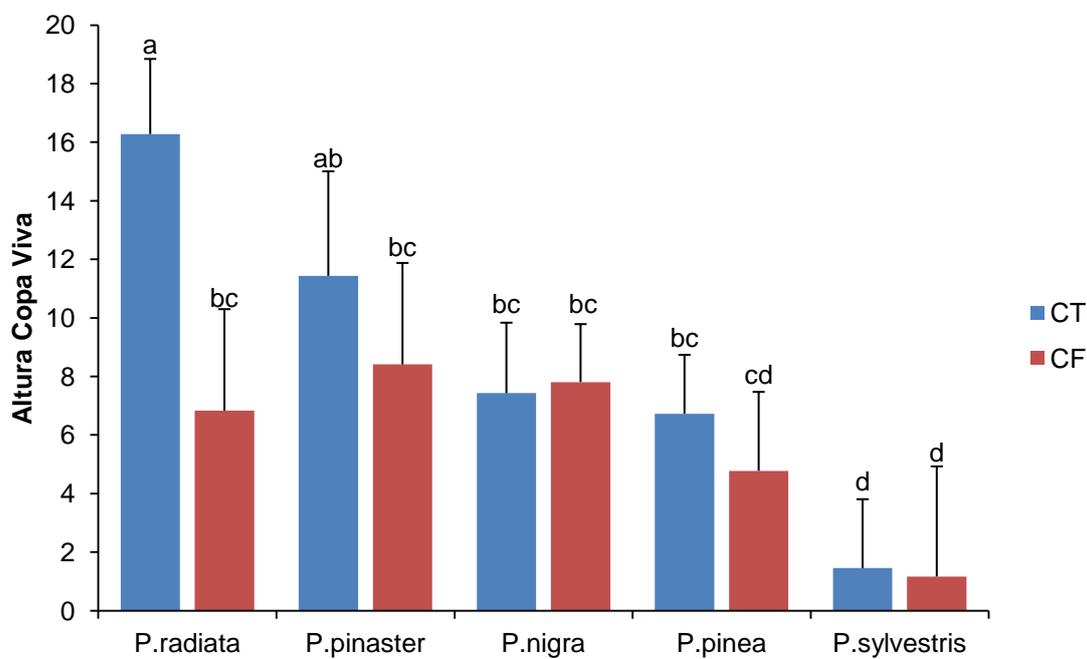


Figura 18. Crecimiento en altura de la copa viva para las cinco especies de pino, inoculadas con *F. circinatum* (CF) o en el tratamiento control (CT). En ambos casos, las plantas no fueron inoculadas con ningún endófito. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-e), denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

4.3. Control Biológico con Endófitos.

En el ensayo *in vivo* se evaluó el efecto de seis endófitos frente a *F. circinatum*. Estos hongos fueron seleccionados por su importancia como potenciales BCA's y los buenos resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* anterior. Cuando estos endófitos se inocularon solos sin la presencia del patógeno, se comprobó que no causaban daño alguno a las plantas, ya que las diferencias de AUDPC entre el tratamiento control CT y los respectivos tratamientos con cada uno de los endófitos, no fueron significativas en ninguna de las combinaciones especies de pino-endófito.

En los tratamientos en los que se inoculó tanto el patógeno como los endófitos, se observó que sobre las plantas de *P. radiata*, dos endófitos redujeron significativamente el daño causado por *F. circinatum* (AUDPC). Éstos fueron los aislados HP047 (p-valor < 0,005) perteneciente a la especie *Chaetomium aureum* y el HP066 (p-valor < 0,025) identificado como *Alternaria sp.*, que disminuyeron el daño en un 27,8% y un 22,2% respectivamente (Figura 19). Por el contrario, la reducción de crecimiento de las plantas de *P. radiata* causada por el patógeno no fue contrarrestada por ninguno de los endófitos testados.

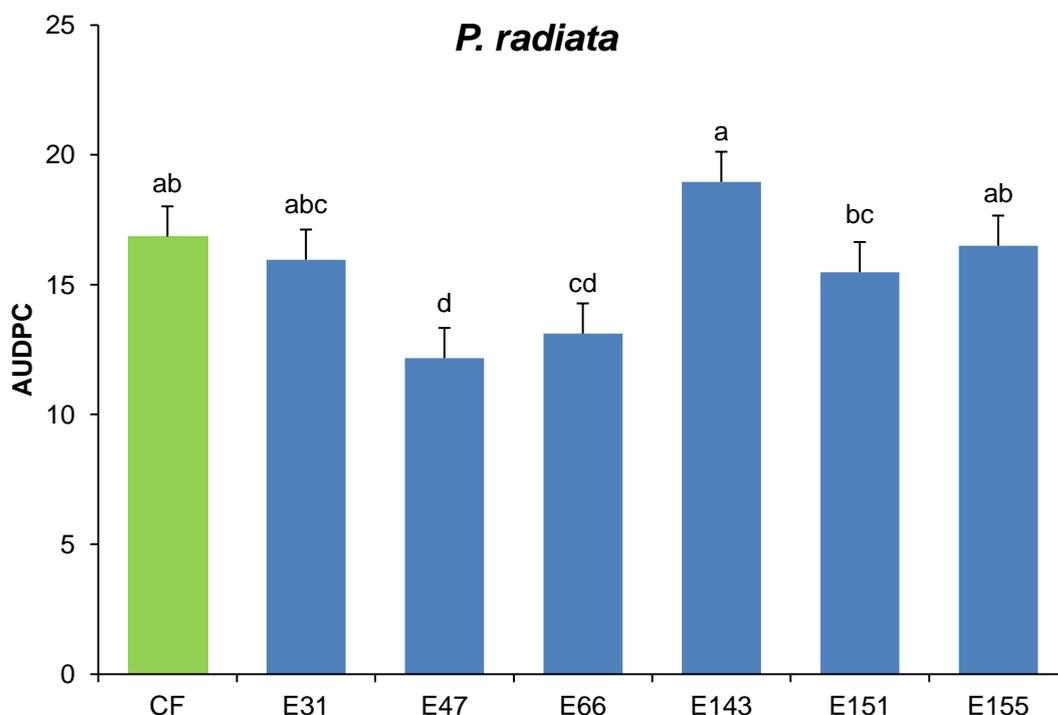


Figura 19. Valor de la variable AUDPC para la especie *P. radiata* cuando las plantas se inocularon sólo con *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

Para las plantas de *P. nigra*, ninguno de los seis endófitos redujo significativamente el valor de la AUDPC. Las plantas inoculadas con los endófitos HP031 (*Trichoderma spirale*) y HP047 (*Chaetomium aureum*), además de con *F. circinatum*, redujeron en un 26,64% y en un 35,15% respectivamente la variable AUDPC respecto a las inoculadas únicamente con el patógeno, aunque esta reducción no fue significativa (p -valor = 0,7388 (HP031) y 0,6600 (HP047)) (Figura 20).

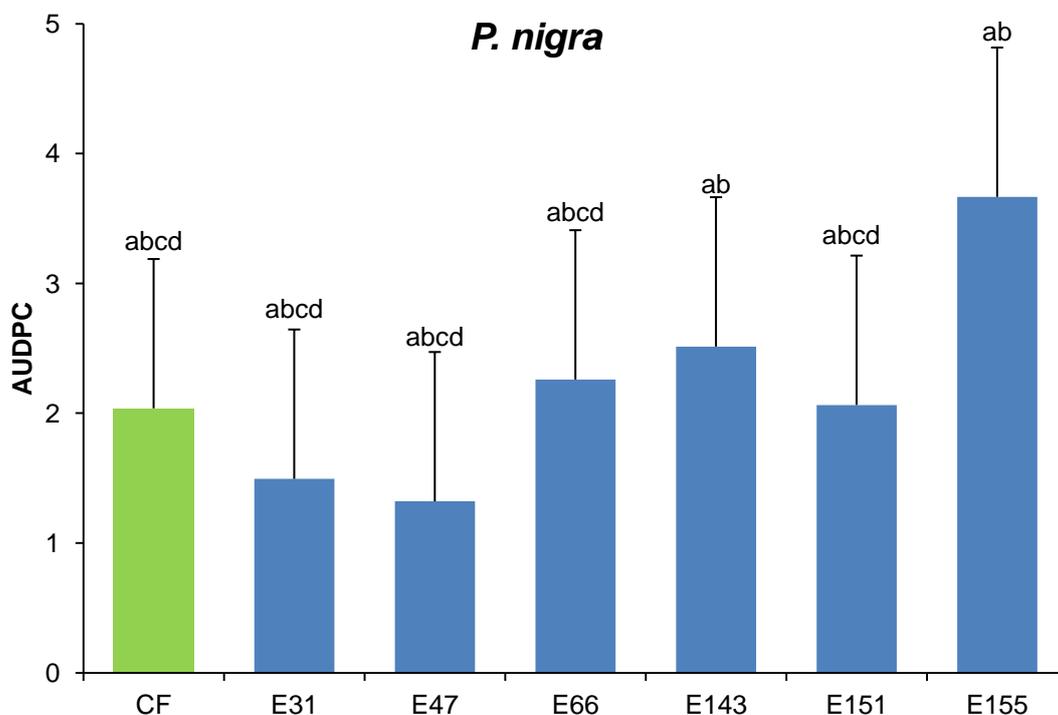


Figura 20. Valor de la variable AUDPC para la especie *P. nigra* cuando las plantas se inocularon sólo con *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

En la especie *P. pinaster*, ninguno de los seis endófitos fue capaz de reducir significativamente los daños causados por *F. circinatum* al igual que ocurrió en *P. nigra*. La variable AUDPC únicamente se vio reducida un 6.17% en aquellas plantas inoculadas con el endófito HP155 (*Trichoderma viride*), aunque la mencionada reducción no fue significativa (p -valor= 0,9231) (Figura 21).

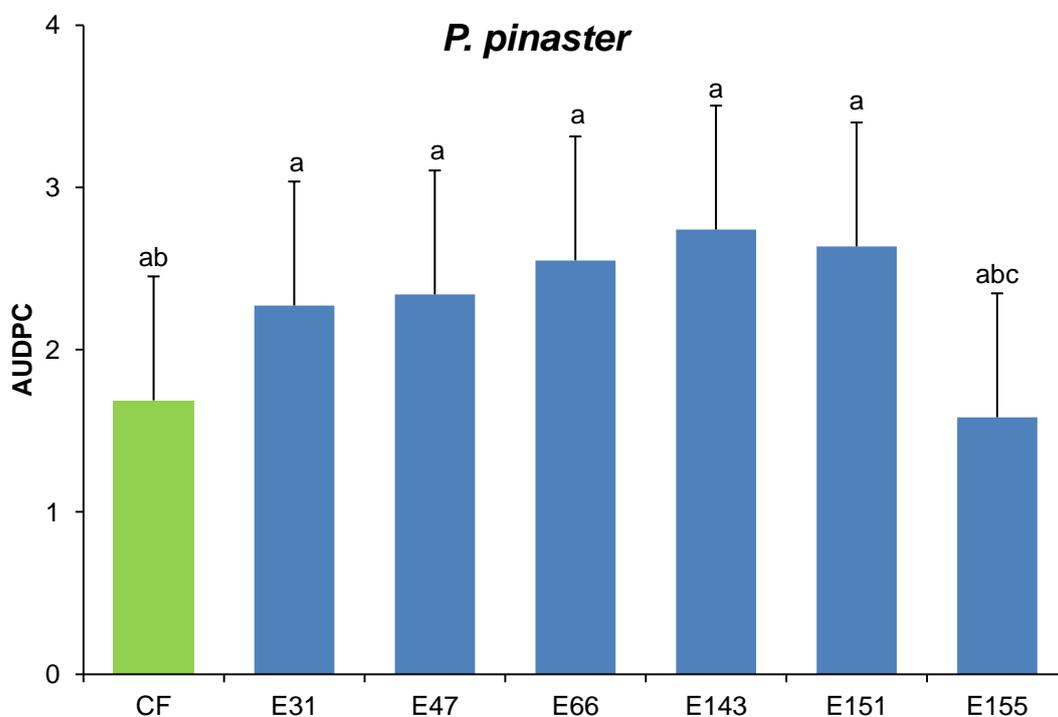


Figura 21. Valor de la variable AUDPC para la especie *P. pinaster* cuando las plantas se inocularon sólo con *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

En los tratamientos en los que se inoculó tanto el patógeno como los endófitos en *P. pinea*, los endófitos no fueron capaces de reducir de manera significativa el valor de la variable AUDPC. En este caso, el menor valor de la variable AUDPC se obtuvo por el tratamiento en que ningún endófito fue inoculado, aunque el valor de la variable en todos los tratamientos evaluados fue muy bajo en esta especie de pino (Figura 22).

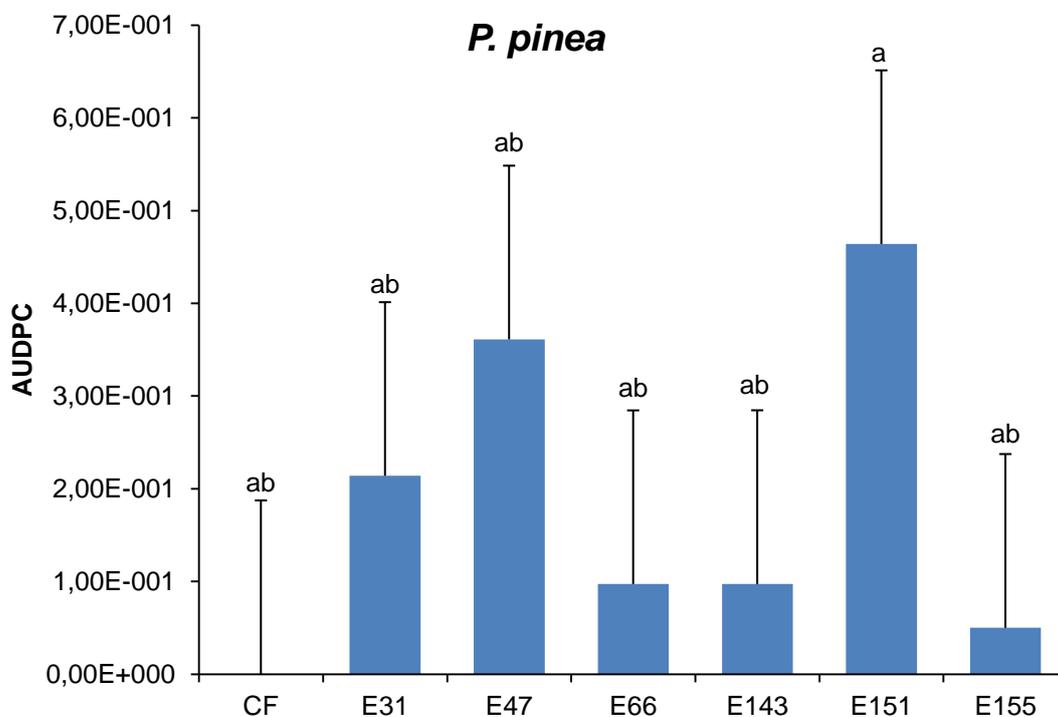


Figura 22. Valor de la variable AUDPC para la especie *P. pinea* cuando las plantas se inocularon sólo con *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

En cuanto a la especie *P. sylvestris*, todos los tratamientos en los que se inoculó un endófito acompañando al patógeno obtuvieron un valor inferior al obtenido por el tratamiento CF, aunque ninguno de ellos fue significativo al 95% de confianza. Destaca el caso de las plantas inoculadas con el endófito HP031 (*Trichoderma spirale*) y *F. circinatum*, que obtuvieron un valor de la variable AUDPC un 47,8% menor que las inoculadas solamente con el patógeno (p-valor = 0,081) (Figura 23).

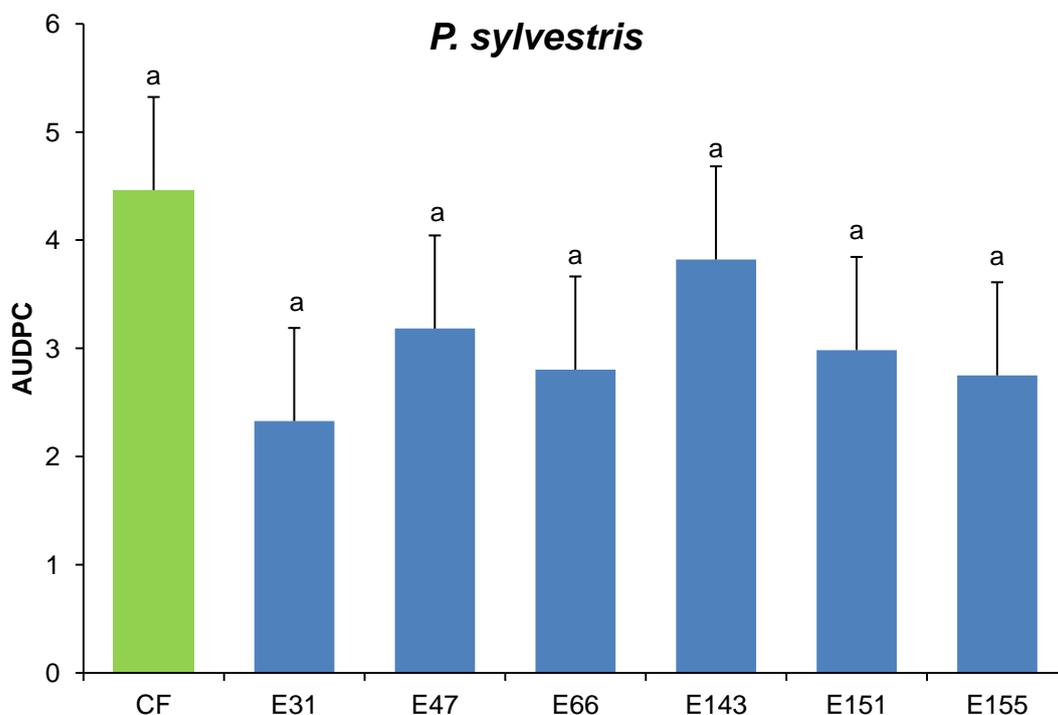


Figura 23. Valor de la variable AUDPC para la especie *P. sylvestris* cuando las plantas se inocularon sólo con *F. circinatum* (CF) o con los distintos endófitos además de *F. circinatum*. Las barras de error representan los errores estándar. Las diferentes letras (a-d) denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las columnas (Test LSD de Fisher).

A la vista de los datos mostrados en estas gráficas, se puede ver claramente cómo únicamente en el caso de *P. radiata*, se produce una reducción significativa de los daños causados por *F. circinatum*, por los dos hongos endófitos ya mencionados *C. aureum* y *Alternaria sp.*, mientras que en el caso de las cuatro especies de pino restantes no vemos reducción significativa alguna de los daños por parte de ningún endófito.

DISCUSIÓN

5. Discusión.

El patógeno del CRP provoca pérdidas económicas sustanciales en plantaciones de pino y en viveros de todo el mundo. En aquellos países en los cuales está presente *F. circinatum*, se han llevado a cabo grandes esfuerzos en busca de medidas de control de la enfermedad o al menos, en busca de medidas que minimicen los daños del patógeno. A pesar de todo, son muy pocos los estudios realizados en los que se haya usado el control biológico como herramienta de lucha contra *F. circinatum*.

En un estudio previo realizado durante el año 2012, fueron seleccionados 154 aislados endófitos de entre una colección de 546 hongos después de un ensayo preliminar, en el que se enfrentaron a *F. circinatum* en un experimento de antagonismo *in vitro* (Martínez Álvarez *et al.*, 2015). Debido a que no siempre los hongos endófitos producen el mismo efecto antagonista *in vitro* sobre el medio de cultivo, que posteriormente sobre la planta hospedante y en base a los buenos resultados obtenidos en este ensayo, seis de los aislados con mejor efecto antagonista, fueron inoculados junto con el patógeno sobre plantas de *P. radiata*, *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *P. nigra* y *P. pinea* en campo, para evaluar su capacidad de reducir los daños causados por *F. circinatum*.

Todas las especies de pino probadas en este ensayo se encuentran entre las 57 consideradas susceptibles a *F. circinatum* (M. J. Wingfield *et al.*, 2008). Pese a esto, nuestros resultados demuestran que los daños causados por el patógeno a las especies *P. pinea* y *P. nigra* no son significativamente más altos que en los tratamientos control. Esta resistencia al patógeno del CRP por parte de ambas especies de pino, ya había sido comprobada con anterioridad (E. Iturrity *et al.*, 2012). Continuando en esta línea, Iturrity *et al.*, (2013) comprobaron de nuevo que *P. pinea* presentaba resistencia frente a *F. circinatum* así como un nivel intermedio de repuesta al patógeno por parte de *P. nigra*. De manera similar en otro ensayo llevado a cabo por Carlucci *et al.* (2007), no se encontraron síntomas de susceptibilidad en *P. nigra*, pero sí en *P. pinea*. Por el contrario, un nuevo ensayo (Martínez-Álvarez *et al.*, 2014) encontró que *P. nigra* resultó ser, tras *P. radiata*, la segunda especie más susceptible al patógeno del CRP. Sin embargo en ese trabajo no se produjeron síntomas de la enfermedad sobre *P. sylvestris* después de inocularle el patógeno. A la vista de los diferentes resultados obtenidos en estos experimentos, parece claro que la susceptibilidad de las diferentes especies de pino, puede depender sustancialmente de diversos factores como por ejemplo la procedencia de las plantas, la edad de las plantas inoculadas, el modo de inoculación o las condiciones ambientales. Lo que queda comprobado en estos ensayos así como en el presente trabajo, es que *P. radiata* es la especie de pino más susceptible a la enfermedad del CRP. De hecho el rango de mortalidad obtenido en el presente estudio, para las plantas de ésta especie (74%), resultó muy similar a la obtenida antes por otros autores (Hodge y Dvorak, 2000; Martínez-Álvarez *et al.*, 2014).

Como ya se comentó en el apartado de resultados del presente trabajo, *P. sylvestris* y *P. pinaster* mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento control en la variable AUDPC, considerándose por lo tanto susceptibles al patógeno. A diferencia de *P. radiata*, estas dos especies no mostraron una reducción significativa de diámetro, altura y copa viva, lo cual nos puede indicar que efectivamente, ambas especies presentan menor grado de susceptibilidad a

F. circinatum, al menos en las condiciones en las que se desarrolló este estudio. Iturrutxa *et al.* (2012) ya habían comprobado en un estudio previo que tanto *P. sylvestris* como *P. pinaster*, mostraban un grado intermedio de susceptibilidad al patógeno. Posteriormente y continuando en esta línea, Iturrutxa *et al.* (2013) encontraron de nuevo por un lado, bajo condiciones controladas en invernadero, una susceptibilidad intermedia en *P. sylvestris* y *P. pinaster* a *F. circinatum*, y por otro lado una susceptibilidad severa al patógeno en *P. radiata* y *P. pinaster* en campo. Por otro lado, Pérez-Sierra *et al.* (2007) comprobaron la virulencia de *F. circinatum* sobre plantas de entre siete y ocho meses de edad, de *P. sylvestris* y *P. pinaster*, además de *P. nigra* y *P. radiata*, resultando igualmente susceptibles a la inoculación artificial del patógeno. Estos estudios por lo tanto, van en consonancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, corroborando que las tres especies de pinos son susceptibles al patógeno.

Los endófitos que redujeron significativamente los daños causados por el patógeno *F. circinatum* en las plantas de *P. radiata* fueron dos, HP047 y HP066. Pertenecen a las especies *Chaetomium aureum* y *Alternaria* sp. respectivamente, y ambas han sido ya reconocidas como BCA's. Recientemente se comprobó que *C. aureum* resultó ser un efectivo controlador biológico contra el patógeno del tizón del arroz, *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, y contra el patógeno del tizón de la vaina, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 2013). Por otro lado el género fúngico *Alternaria* incluye especies saprófitas, endófitas y patógenas (Thomma, 2003). Algunas de ellas han sido ya usadas como antagonistas con otros patógenos de plantas, debido a que a partir de especies de *Alternaria*, algunos metabolitos muestran diversas actividades biológicas como por ejemplo propiedades fitotóxicas, citotóxicas y antimicrobianas (Lou *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto es *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. que demostró un antagonismo considerable frente a *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque hongo que provoca chancros, muerte de ramas y defoliación sobre *Quercus* spp., (Campanile *et al.*, 2007). De manera similar, Feng y Yangmin (2010) consiguieron extraer del cultivo de *Alternaria* spp., cuatro compuestos generadores de una actividad inhibidora significativa en el crecimiento de varios fitopatógenos, incluida alguna especie del género *Fusarium*.

A pesar de que los aislados de *Trichoderma* habían obtenido buenos resultados en el ensayo *in vitro* (Martínez Álvarez *et al.*, 2015), estos no tuvieron la misma efectividad en las condiciones *in vivo*. En un estudio llevado a cabo con anterioridad, Martínez-Álvarez (2012) evaluó la capacidad de control biológico de la enfermedad del CRP mediante el uso de *T. harzianum*, especie fúngica empleada con éxito frente a muchos otros patógenos vegetales. Mientras que *in vitro*, éste mostró un efecto significativo sobre el crecimiento de *F. circinatum*, *in vivo* sobre las plantas no se pudo extraer ninguna conclusión clara. Moraga-Suazo *et al.*, (2011) realizaron en invernadero, otro estudio en el que se probó con distintas cepas de *Trichoderma* spp., además de *Clonostachys* spp., como controladores de *F. circinatum*. En él no obtuvieron respuesta antagonista cuando estos dos hongos eran añadidos al sustrato después que el patógeno, pero si obtuvieron esta respuesta cuando los hongos se añadieron al sustrato antes que el patógeno.

Tal vez la metodología de inoculación llevada a cabo en el presente estudio, haya podido ser la razón para el diferente comportamiento de estos aislados. Pese a ser hongos capaces de colonizar el floema e incluso la albura de los árboles, (Jankowiak, 2006), *Trichoderma* spp. son hongos típicos de suelo, presentes habitualmente en la rizosfera (Harman *et al.*, 2004). Por esta razón pueden haber resultado insuficientes 42 días para que el endófito se establezca en el hospedante y colonice los tejidos que el patógeno fuera a atacar. Quizás la mejor manera para utilizar este grupo específico de endófitos como BCA's, sea usar en la producción de plantas un sustrato al que se añadan los aislados de *Trichoderma* que sean de interés, como ya se probó en el estudio realizado por Martínez-Álvarez *et al.* (2012).

En vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, resulta prometedor el empleo de hongos endófitos como controladores biológicos de la enfermedad del CRP, pero aún se precisa de más investigación. Se debería estudiar con mayor profundidad los aislados HP047 (*C. aureum*) y HP066 (*Alternaria* sp.), con el fin de reforzar el efecto positivo que tienen en la reducción de daños causados por el patógeno sobre las plantas enfermas. Igualmente se deberían ensayar diferentes métodos para la aplicación de los antagonistas, además de probar muchos otros endófitos a fin de encontrar un BCA efectivo para la enfermedad.

CONCLUSIONES

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

6. Conclusiones.

1. *Pinus radiata* resultó la especie de pino más susceptible de las seis al CRP, siendo en la que más síntomas mostró *F. circinatum* y también en la que más se redujo el crecimiento de las plantas en diámetro, altura y copa viva, como consecuencia de los daños del patógeno. *P. sylvestris* y *P. pinaster* resultaron susceptibles al CRP, siendo la segunda y la tercera especie respectivamente, que más síntomas presentaron de la enfermedad del CRP, pese a lo cual el crecimiento de las plantas en diámetro, altura y copa viva no se vio afectado. *P. pinea* y *P. nigra* fueron las dos únicas especies de pino que mostraron resistencia a la inoculación de *F. circinatum*, no presentando síntomas del patógeno ni viéndose reducido su crecimiento en diámetro, altura y copa viva.
2. Ninguno de los seis hongos endófitos utilizados causó daño alguno a las plantas al ser inoculados sólo sin *F. circinatum*, ya que en ninguno de los casos las diferencias entre el AUDPC para el CT y para los controles de los respectivos endófitos, fueron significativas.
3. Dos de los seis aislamientos de hongos endófitos testados, pertenecientes a las especies *C. aureum* y *Alternaria* sp. redujeron significativamente los síntomas causados por *F. circinatum* sobre las plantas de *P. radiata*. Estos aislamientos tienen potencial para ser utilizados como BCA's de la enfermedad, pero todavía necesitan ser estudiados más a fondo.

BIBLIOGRAFÍA

Alumno: Raúl Arcadio Fernández González
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (CAMPUS DE PALENCIA) – E.T.S. DE INGENIERÍAS AGRARIAS
Titulación de: Máster en Ingeniería de Montes

- Abdullah, M., Ali, N., & Suleman, P. (2008). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 27(10), 1354–1359. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.007>
- Adams, D. (1989). *Incidence of pine pitch canker in California, 1988--1989*. Californian Department of Forestry and Fire Protection: Sacramento, CA.
- Aegerter, B. J., & Gordon, T. R. (2006). Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management*, 235(1-3), 14–17. <http://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.07.011>
- Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, a., Armengol, J., García-Jiménez, J., & Berbegal, M. (2012). Efficacy of hot water treatment to reduce the incidence of *Fusarium circinatum* on *Pinus radiata* seeds. *Forestry*, 85(5), 629–635. <http://doi.org/10.1093/forestry/cps074>
- Alonso, R., & Bettucci, L. (2009). First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 91–92. <http://doi.org/10.1071/DN09039>
- Arnold, a E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 100, pp. 15649–15654). <http://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C., & Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24(2), 135–142. [http://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00034-8](http://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00034-8)
- Barrows-Broadus J., Dwinell L, D. (1985). Evaluation of *Arthrobacter* sp. for biological control of the pitch canker fungus (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) on slash pines. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 888–892.
- Barrows-Broadus J., D. L. D. (1984). Variation in susceptibility to the pitch canker fungus among half-sib families of Virginia pine. *Phytopathology*, 74, 438–444.
- Barrows-Broadus J., K. T. J. (1981). Inhibition of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, the causal agent of pine pitch canker, by the soil bacterium *Arthrobacter* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 20–27.
- BASAK, A.C., A. S. R. B. (2011). Biological control of *Fusarium solani* sp *dalbergiae*, the wilt pathogen of *Dalbergia sissoo*, by *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *BASAK, A.C., AND S.R. BASAK*, 23, 460–466.
- Berbegal, M., Landeras, E., Sánchez, D., Abad-Campos, P., Pérez-Sierra, a., & Armengol, J. (2015). Evaluation of *Pinus radiata* seed treatments to control

- Fusarium circinatum*: effects on seed emergence and disease incidence. *Forest Pathology*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/efp.12204>
- Berbegal, M., Pérez-Sierra, a, Armengol, J., & Grünwald, N. J. (2013). Evidence for multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, 103(8), 851–61. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-11-12-0281-R>
- Bernal-Vicente, A., Ros, M., & Pascual, J. A. (2009). Increased effectiveness of the *Trichoderma harzianum* isolate T-78 against *Fusarium* wilt on melon plants under nursery conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(5), 827–833. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3520>
- Bezoes, D., Lomba, J., Martínez-Alvarez, P., Fernández, M., & Díez, J. (2012). Effects of Pruning in Monterrey Pine Plantations Affected by *Fusarium circinatum*. *Forest Systems*, 21(3), 481–488. Retrieved from <http://revistas.inia.es/index.php/fs/article/view/2262>
- Blakeslee G.M., O. S. W. (1979). Significant mortality associated with pitch canker infection of slash pine in Florida. *Plant Disease Reporter*, 63, 1023–1025.
- Blakeslee G.M., Oak S.W., Gregory W., M. C. S. (1978). Natural associations of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* with *Pissodes nemorensis*. *Phytopathology*, 12, 208.
- Blakeslee, G.M.; Rockwood, D. L. (1999). Variation in resistance to pitch canker in slash and loblolly pines. In *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey workshop, California, USA, 30 November to 3 December 1998. Forestry and Forest Products*. (Vol. 112, pp. 35–39).
- Bonello P., Gordon T.R., S. A. J. (2001). Systemic induced resistance in Monterey pine. *Forest Pathology*, 31, 99–106.
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F., & Amaro, P. (2002). First Report of Pitch Canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 95, 770. <http://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1079A>
- Britz, H., Wingfield, B. D., Coutinho, T. a., & Wingfield, M. J. (2002). Sequence characterized amplified polymorphic markers for the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 577–580. <http://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00324.x>
- Britz H., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Marasas W.F.O., W. M. J. (2005). Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella circinatum* in South Africa. *Plant Pathology*, 54, 46–52.
- Britz H., Coutinho T.A., Wingfield M.J., Marasas W.F.O, G. T. R. (1999). *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella*

- fujikuroi species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1198–1201.
- BRITZ, H., T.A. COUTINHO, T.R. GORDON, A. M. J. W. (2001). Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany*, 67, 609–614.
- Campanile, G., Ruscelli, A., & Luisi, N. (2007). Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. *European Journal of Plant Pathology*, 117(3), 237–246. <http://doi.org/10.1007/s10658-006-9089-1>
- Carlucci A., Colatruglio L., F. S. (2007). First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, 91, 1683.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9. <http://doi.org/10.2307/1943154>
- CHO, W.D., A. H. D. S. (2004). *List of plant diseases in Korea* (4th ed.). The Korean Society of Plant Pathology.
- Cook R. J., B. K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. APS Press, The America Phytopathological Society.
- Correll J.C., Gordon T.R., M. A. (1992). Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch pine canker fungus *Fusarium subglutinans* var. *pini*. *Phytopathology*, 82, 415–420.
- Correll J.C., Gordon T.R., McCain A.H., Fox J.W., Koehler C.S., Wood D.L., S. M. E. (1991). Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease*, 75, 676–682.
- Coutinho T.A., Steenkamp E.T., Mongwaketsi K., Wilmot M., W. M. J. (2007). First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology*, 36, 256–261.
- Covert S.F., Briley A., Wallace M.M., M. V. T. (1999). Partial MAT-2 gene structure and the influence of temperature on mating success in *Gibberella circinata*. *Fungal Genetics and Biology*, 28, 43–54.
- CRITCHFIELD, W.B., L. L. E. (1966). *Geographic distribution of the pines of the world*. U.S. Department of Agriculture, *Miscellaneous Publication 991*. Washington, DC.: U.S. Department of Agriculture, *Miscellaneous Publication 991*.
- Dekker, J., & Georgopoulos, S. G. (1982). *Fungicide Resistance in Crop Protection*. (S. G. Dekker, J.; Georgopoulos, Ed.).

- Dumroese, R. K., James, R. L., Wenny, D. L., Giiiigan, C. J., Kasten, R., Robert, L., ... Douglas-fir, C. J. (1988). Douglas-fir Seed Treatments: Effects on Seed Germination and Seedborne Organisms 1, 2. In *Proceedings of the combined meeting of the western forest nursery associations* (pp. 155–160). R. C. Shearer.
- Dwinell, L. D. (1985). Pitch Canker: A Disease Complex of Southern Pines. *Plant Disease*. <http://doi.org/10.1094/PD-69-270>
- Dwinell, L. D., Adams, D., Guerra-Santos, J. J., & Aguirre, J. R. M. (1998). Pitch canker disease of *Pinus radiata*. In *VII International Congress of Plant Pathology, 9 - 16 August 1998* (pp. 9–16). Edinburgh, Scotland. Retrieved from <http://www.bspp.org.uk/icpp98/3.7/30.html>
- Dwinell L.D., B.-B. J. (1978). Recovery of the pine pitch canker fungus from pine plantations and seed orchard soil. *Phytopathology News*, 12, 207.
- Dwinell L.D., B.-B. J. (1981). Pitch canker in seed orchards. In *Proceedings of the Sixteenth Southern Tree Improvement Conference, 27--28 May 1981* (pp. 234–241). Sponsored Publication.
- Dwinell L.D., F. S. W. (1999). Contamination of pine seeds by the pitch canker fungus. In *National Proceedings of the Forest and Conservation Nursery Associations* (pp. 41–42). USDA, Forest Service.
- Dwinell L.D., P. W. R. (1977). Pitch canker of slash pine in Florida. *Journal of Forestry*, 75, 488–489.
- Enebak, S. A., & Stanosz, G. R. (2003). Responses of conifer species of the Great Lakes region of North America to inoculation with the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum*. *Forest Pathology*, 33(5), 333–338. <http://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2003.00334.x>
- EPPO. (2009). PM 7/91(1): *Gibberella circinata*. *EPPO Bulletin*, 39(3), 298–309. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02317.x>
- European Commission (EC). Regulation (EC) No 1107/2009 of the european parliament and of the council of 21 october 2009 concerning the placing of protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, L 309 Official Journal of the European Union 1–50 (2009). Official Journal of the European Union.
- Feng, C., & Yangmin, M. (2010). Isolation and anti-phytopathogenic activity of secondary metabolites from *Alternaria* sp. FL25, an endophytic fungus in *Ficus carica*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 16(1), 76–78. <http://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2010.00076>
- Fernández, A., & Sarmiento, A. (2004). *El pino radiata (Pinus radiata). Manual de gestión forestal sostenible*. Junta de Castilla y León.

- Fraedrich B.R., D. L. D. (1997). Mortality of longleaf pine seedlings caused by *Fusarium subglutinans* and an evaluation of potential inoculum sources. In *Proceedings of the 3rd meeting of the IUFRO working group S7.03.04, diseases and insects in forest nurseries, May 1994* (pp. 48–54). US Department of Agriculture, Forest Services, Forest Health Protection.
- Gao, F. K., Dai, C. C., & Liu, X. Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346–1351. Retrieved from <Go to ISI>://000280352100001
- Gordon, T. R. (2006). Pitch canker disease of pines. *Phytopathology*, 96(6), 657–659. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0657>
- Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Petersen, J. C., & Friel, C. J. (2006). Potential diversity in vegetative compatibility groupings in the California population of *Gibberella circinata*. *Mycological Research*, 110(8), 936–940. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.05.001>
- Gordon, T. R., Storer, A. J., & Wood, D. L. (2001). The Pitch Canker Epidemic in California. *Plant Disease*. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1128>
- Gordon, T., Wikler, K., Clark, S., Okamoto, D., Storer, A., & Bonello, P. (1998). Resistance to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, in Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Pathology*, 47(6), 706–711. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=2FeIKOELaFPh5GD7fel&page=2&doc=17
- Gordon T.R., Okamoto D., Storer A.J., W. D. L. (1998). Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *HortScience*, 33, 868–871.
- Guerra-Santos, J. J. (1998). Pitch canker on Monterey pine in Mexico. In T. R. Devey, M.E.; Matheson, A.C.; Gordon (Ed.), *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California, USA. 30 November to 3 December 1998*. (Vol. 112, pp. 58–61).
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hepting G.H., R. E. R. (1946). Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry*, 44, 724–744.
- Hepting G.H., R. E. R. (1953). Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathology*, 43, 475.
- Hermoso, E., Carballo, J., & Fernandez-Golfin, J. I. (2007). Structural characterization of *Pinus radiata* D. Don timber from Pais Vasco (Spain) according to standard

- modifications. *Maderas: Ciencia Y Tecnologia*, 9(3), 223–232. Retrieved from <Go to ISI>://000255738500003
- Hodge, G. R., & Dvorak, W. S. (2007). Variation in pitch canker resistance among provenances of *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* from Mexico and Central America. *New Forests*, 33(2), 193–206. <http://doi.org/10.1007/s11056-006-9023-6>
- Hodge G.R., D. W. S. (2000). Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests*, 19, 241–258.
- Hoover K., Wood D.L., Storer A.J., Fox J.W., B. W. E. (1996). Transmission of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pinii*, to Monterey pine. *Canadian Entomologist*, 128, 981–994.
- Howell, C. R. (2003). Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1983). Gliovirin, a New Antibiotic From *Gliocladium-Virens*, and Its Role in the Biological-Control of *Pythium-Ultimum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(3), 321–324. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1983QJ62400006
- Huss M.J., Campbell C.L., Jennings B.D., L. J. F. (1996). Isozyme variation among biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section *Liseola*). *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3750–3756.
- Inman A.R., Kirkpatrick S.C., Gordon T.R., S. D. V. (2008). Limiting effects of low temperature on growth and spore germination in *Gibberella circinata*, the cause of pitch canker in pine species. *Plant Disease*, 92, 542–545.
- Iturrutxa, E., Ganley, R. J., Raposo, R., García-Serna, I., Mesanza, N., Kirkpatrick, S. C., & Gordon, T. R. (2013). Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. *Forest Pathology*, 43(6), 488–495. <http://doi.org/10.1111/efp.12061>
- Iturrutxa, E., Ganley, R. J., Wright, J., Heppe, E., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Wingfield, M. J. (2011). A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. *Fungal Biology*, 115(3), 288–295. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.12.014>
- Iturrutxa, E., Mesanza, N., Elvira-Recuenco, M., Serrano, Y., Quintana, E., & Raposo, R. (2012). Evaluation of genetic resistance in *Pinus* to pitch canker in Spain. *Australasian Plant Pathology*, 41(6), 601–607. <http://doi.org/10.1007/s13313-012-0160-4>

- Jacobs, A., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J., A., & R. & Wingfield, B. D. (2007). Characterization of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Chile. *South African Journal of Science*, 103(5-6), 253–257.
- Jankowiak, R. (2006). Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. *Annals of Forest Science*, 63(7), 801–808. <http://doi.org/10.1051/fores:2006063>
- Kayihan, G. C., Huber, D. A., Morse, A. M., White, T. L., & Davis, J. M. (2005). Genetic dissection of fusiform rust and pitch canker disease traits in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 948–958. <http://doi.org/10.1007/s00122-004-1915-2>
- Kelley W.D.; Williams, J. C. (1982). Incidence of Pitch Canker Among Clones of Loblolly Pine in Seed Orchards. *Plant Disease*, 66(1), 1171. <http://doi.org/10.1094/PD-66-1171>
- Kniewald, J. (2003). Risks evaluation from pesticide residues in food. In *Current Studies of Biotechnology, Vol Iii* (pp. 149–159). Zagreb, Croatia: CROATIAN SOCIETY BIOTECHNOLOGY. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000189459300011
- Kobayashi, T. (2007). *Index of fungi inhabiting woody plants in Japan. Host, distribution and literature*. Zenkoku-Noson-Kyoiku Kyokai Publishing Co., Ltd.
- Kobayashi T., M. M. (1989). Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease of Japanese forests. *Forest Pests*, 40, 169–173.
- Kratka S.H., Blakeslee G.M., Dorset R.D., O. S. W. (1979). Seasonal development of sporodochia of the pitch canker fungus, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, on diseased slash pines in Florida. *Phytopathology*, 69, 1034.
- Kuhlman, E. G. (1982). Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia*, 74, 759–768.
- Kuhlman, E. G. (1987). Effects of Inoculation Treatment with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on Dieback of Loblolly and Slash Pine Seedlings. *Plant Disease*. <http://doi.org/10.1094/PD-71-0161>
- Kuhlman E.G., Dwinell L.D., Nelson P.E., B. C. (1978). Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia*, 70, 1131–1143.
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., Méndez-Lodos, S., ... Armengol, J. (2005). Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp . in Northern Spain. *Plant Disease*, 89(9), 1015.
- Latunde-Dada, a O. (1993). Biological-Control of Southern Blight Disease of Tomato Caused by *Sclerotium rolfsii* with Simplified Mycelial Formulations of *Trichoderma*

- koningii. *Plant Pathology*, 42(4), 522–529. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01532.x>
- Laucirica J.M., M. J. R. (1997). Presencia de *Fusarium subglutinans* F. sp. pini en viveros de pino radiata en Bizkaia. In *XIV Reunión anual del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques y Jardines, at Zaragoza*.
- Lopez-Zamora, I., Bliss, C., Jokela, E. J., Comerford, N. B., Grunwald, S., Barnard, E., & Vasquez, G. M. (2007). Spatial relationships between nitrogen status and pitch canker disease in slash pine planted adjacent to a poultry operation. *Environmental Pollution*, 147(1), 101–111. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.025>
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18(5), 5891–5935. <http://doi.org/10.3390/molecules18055891>
- Malinowski, D. P., Zuo, H., Belesky, D. P., & Alloush, G. a. (2005). Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant and Soil*, 267(1-2), 1–12. <http://doi.org/10.1007/s11104-005-2575-y>
- MAPA. Informe de la reunión del grupo de trabajo de laboratorio de diagnóstico y prospecciones fitosanitarias. (1996).
- MAPA. Real Decreto 637/2006, de 26 de mayo, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Nirenberg et O'Donnell, Pub. L. No. BOE 137 (2006). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain.
- Martínez Álvarez, P., Blanco Díaz, J., De Vallejo Santotis, M., Pajares Alonso, J. A., Alvez Santos, F. M., & Diez Casero, J. J. (2009). Hongos asociados a la enfermedad del chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) en la Comunidad Autónoma de Cantabria. In *5º Congreso Forestal Español* (pp. 1–9). Ávila, Spain.
- Martínez-Álvarez, P. (2011). *Effect of Trichoderma harzianum on Monterey pine seedlings infected by Fusarium circinatum*. University of Valladolid.
- Martínez-Álvarez, P.; Alves-Santos, F.M.; Diez, J.J. (2012). *In Vitro and In Vivo Interactions between Trichoderma viride and Fusarium circinatum*. *Silva Fennica*, 46 (3), 303-316.
- Martínez-Álvarez, P.; Fernández-González, R.; Sanz-Ros, A.V.; Pando, V. & Diez, J.J. (2015). *Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease on Pinus radiata seedlings*. Submitted to *Biological Control*.
- Martínez Álvarez, P., Fernández González, R.A., Sanz Ros, A.V., Miravalles Cerezo, A., Diez Casero, J. J. (2013). Antagonismo in vitro de hongos endófitos frente a

- Fusarium circinatum*. In S. E. de C. Forestales (Ed.), *6º Congreso Forestal Español* (pp. 1–10). Vitoria-Gasteiz.
- Martínez-Álvarez, P., Pando, V., & Diez, J. J. (2014). Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Plant Pathology*, 1086–1094. <http://doi.org/10.1111/ppa.12187>
- Matheson A.C., Devey M.E., Gordon T.R., Werner W., Vogler D.R., Balocchi C., C. M. J. (2006). Heritability of response to inoculation by pine pitch canker of seedlings of radiata pine. *Australian Forestry Journal*, 70, 101–106.
- McCain A.H., Koehler C.S., T. S. A. (1987). Pitch canker threatens California pines. *California Agriculture*, 41, 22–23.
- Mead, D. J. (2000). An assessment of pine pitch canker in Radiata pine. *New Zealand Journal of Forestry*, 44, 40–42.
- Mehrotra R., Aneja K., Gupta A., A. A. (1988). *Fungi-agents of biological control in biocontrol of plant diseases*. (M. K. G. & G. K.L., Ed.). Boca Ratón: C.R.C. Press.
- Miller, J. D. (1986). Toxic metabolites of epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. In F. & Van den Heuvel (Ed.), *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press.
- Mitchell, R., Zwolinski, J., Jones, N. B., & Coutinho, T. (2004). The effect of applying prophylactic measures on the post-planting survival of *Pinus patula* in South Africa. *Southern African Forestry Journal*, 200, 51–58.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 412–417.
- Moraga-Suazo, P., Orellana, L., Quiroga, P., Balocchi, C., Sanfuentes, E., Whetten, R. W., ... Valenzuela, S. (2014). Development of a genetic linkage map for *Pinus radiata* and detection of pitch canker disease resistance associated QTLs. *Trees*, 28(6), 1823–1835. <http://doi.org/10.1007/s00468-014-1090-2>
- Morse, A. M., Nelson, C. D., Covert, S. F., Holliday, A. G., Smith, K. E., & Davis, J. M. (2004). Pine genes regulated by the necrotrophic pathogen *Fusarium circinatum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(5), 922–932. <http://doi.org/10.1007/s00122-004-1719-4>
- Nelson P.E., Toussoun T.A., M. W. F. O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press: University Park, PA.
- Nirenberg H. I., O. I K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 434–458.

- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465–493. <http://doi.org/10.2307/3761407>
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78. <http://doi.org/10.1007/BF02464387>
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research*, 111(Pt 7), 832–9. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.009>
- Petrini, O. (1991). *Fungal endophytes of tree laeves. Microbial Ecology of Tree Leaves*. (J. H. A. & S. S. Hirano, Ed.). New York: Springer Verlag.
- Petrini, O., F. P. J. (1988). A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society*, 91, 233–238.
- Pfenning, L., Costa, S., de Melo, M., Costa, H., Ventura, J., Auer, C., & dos Santos, A. (2014). First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(3), 210–216. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>
- R., W. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of the other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837–845.
- Richardson, S. N., Walker, A. K., Nsiama, T. K., McFarlane, J., Sumarah, M. W., Ibrahim, A., & Miller, J. D. (2014). Griseofulvin-producing *Xylaria* endophytes of *Pinus strobus* and *Vaccinium angustifolium*: evidence for a conifer-understory species endophyte ecology. *Fungal Ecology*, 11, 107–113. <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.05.004>
- Romeralo, C., Santamaría, O., Pando, V., & Diez, J. J. (2015). Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings. *Biological Control*, 80, 30–39. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.010>
- Romón, P., Troya, M., Gamarra, M. E. F. De, Eguzkitza, A., Iturrondobeitia, J. C., & Goldarazena, A. (2008). Fungal communities associated with pitch canker disease of *Pinus radiata* caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain: association with insects and pathogen – saprophyte antagonistic interactions. *Canadian Journal Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 30(2), 241–253.
- Ruano-Rosa, D., Moral-Navarrete, L. Del, Lopez-Herrera, C. J., & Del Moral-Navarrete, L. (2010). Selection of *Trichoderma* spp . isolates antagonistic to *Rosellinia necatrix*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(4), 1084–1097.

- Runion G.B., Cade S.C., B. R. I. (1993). Effects of carbofuran and thiabendazole on incidence of pitch canker of loblolly pine. *Plant Disease*, 77, 166–169.
- Sakamoto J.M., G. R. (2006). Factors influencing infection of mechanical wounds by *Fusarium circinatum* on Monterey pines (*Pinus radiata*). *Plant Pathology*, 55, 130–136.
- Santos J.J.G., T. D. B. (1991). Algunos aspectos sobre el cancro resinoso de los pinos. In *VI Simposio Nacional Sobre Parasitología Forestal, October 1991*. (p. 31).
- Schweigkofler W., O'Donnell K., G. M., Schweigkofler, W., O'Donnell, K., & 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 a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3512–3520. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3512-3520.2004>
- SIVAN, A., O. UCKO, A. I. C. (1987). Biological-Control of *Fusarium* Crown Rot of Environmentally friendly methods for the integrated management of pine pitch canker (PPC) disease 44 Tomato by *Trichoderma harzianum* under Field Conditions. *Plant Disease*, 71, 587–592.
- Snyder W.C., Toole E.R., H. G. H. (1949). *Fusaria* associated with mimosa wilt, sumac wilt and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research*, 78, 365–382.
- Soria, S., Alonso, R., & Bettucci, L. (2012). Endophytic Bacteria from *Pinus taeda* L. as Biocontrol Agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 281–284. <http://doi.org/10.4067/S0718-58392012000200018>
- Spokes, J. R., David, R. M. M., & Hayman, S. (1981). Effects of plant protection chemicals on vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Pesticide Science*, 12(3), 346–350. <http://doi.org/10.1002/ps.2780120314>
- Steenkamp, E. T., Rodas, C. a., Kvas, M., & Wingfield, M. J. (2012). *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 483–491. <http://doi.org/10.1007/s13313-012-0120-z>
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. a., Wingfield, M. J., & Marasas, W. F. O. (1999). Differentiation of *Fusarium* subglutians f. sp. pini by histone gene sequence data. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3401–3406.
- Storer, a, Gordon, T., Wood, D., & Bonello, P. (1997). Pitch canker disease of pines - Current and future impacts. *Journal of Forestry*, 95(12), 21–26. Retrieved from <http://links.isiglobalnet2.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=meke ntosj&SrcApp=Papers&DestLinkType=FullRecord&DestApp=WOS&KeyUT=A1997YJ87500008\papers2://publication/uuid/6CFE3F90-30C1-4E86-8790-E081DEA91A03>

- Storer, a J., Gordon, T. R., Dallara, P. L., & Wood, D. L. (1994). Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *California Agriculture*, 48(6), 9–13.
- Storer, A. J., Wood, D. L., & Gordon, T. R. (2004). Twig beetles, *Pityophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae), as vectors of the pitch canker pathogen in California. *The Canadian Entomologist*, 136(05), 685–693. <http://doi.org/10.4039/n03-118>
- Storer A.J., Bonello P., Gordon T.R., W. D. L. (1999). Evidence of resistance to the pitch canker pathogen (*Fusarium circinatum*) in native stands of Monterey pine (*Pinus monticola*). *Forest Science*, 45, 500–505.
- Storer A.J., Gordon T.R., C. 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., Wood D.L., G. T. R. (2002). The epidemiology of pitch canker of Monterey pine in California. *Forest Science*, 48, 694–700.
- Swarthout, D., Harper, E., Judd, S., Gonthier, D., Shyne, R., Stowe, T., & Bultman, T. (2009). Measures of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 88–93. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.002>
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225–236. <http://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Tripathi, S., Kamal, S., Sheramati, I., & Oelmuller, R. (2008). Mycorrhizal Fungi and Other Root Endophytes as Biocontrol Agents Against Root Pathogens. *Mycorrhiza*, 281–306. http://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_14
- Viljoen, A., Wingfield, M. J., Kemp, G. H. J., & Marasas, W. F. O. (1995). Susceptibility of pines in South Africa to the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Plant Pathology*, 44(5), 877–882. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02747.x>
- Viljoen A., Marasas W.F.O., Wingfield M.J., V. C. D. (1997). Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. *Mycological Research*, 101, 437–445.
- Viljoen A., Wingfield M.J., M. W. F. O. (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on seedlings in South Africa. *Plant Disease*, 78, 309–312.
- Wang, Y. L., Liu, S. Y., Mao, X. Q., Zhang, Z., Jiang, H., Chai, R. Y., ... Sun, G. C. (2013). Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1480–1490. <http://doi.org/10.1111/jam.12153>

- White, J. F., Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (1997). Modifications of host cells and tissues by the biotrophic endophyte *Epichloe amarillans* (Clavicipitaceae; Ascomycotina). *Canadian Journal of Botany*, 75(7), 1061–1069. <http://doi.org/10.1139/b97-117>
- Wikler, K. R. ., & Gordon, T. R. (2000). An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany*. <http://doi.org/10.1139/cjb-78-6-709>
- Wikler K.R., Gordon T.R., C. S. L. (2000). Potential for outcrossing in an apparently asexual population of *Fusarium circinatum*, the casual agent of pitch canker disease. *Mycologia*, 92, 1085–1090.
- Wingfield, B. D., Steenkamp, E. T., Santana, Q. C., Coetzee, M. P. a., Bam, S., Barnes, I., ... Wingfield, M. J. (2012). First fungal genome sequence from Africa: A preliminary analysis. *South African Journal of Science*, 108(1/2), 1–9. <http://doi.org/10.4102/sajs.v108i1/2.537>
- Wingfield, M. J., Hammerbacher, A., Ganley, R. J., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., & Coutinho, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* -- a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37, 319–334.
- Wingfield M.J., Jacobs A., Coutinho T.A., Ahumada R., W. B. D. (2002). First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology*, 51, 397.
- Yang D., L. G. (1995). *Phaeotheca dimorphospora* as a potential biocontrol agent for shoot blight caused by *Gremmeniella abietina*,. *Canadian Journal Plant Pathology*, 17, 7–12.