Pasantía de Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas
Profundización en Biotecnología

Determinación de la presencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus taeda* en vivero y desarrollo de estrategias para su biocontrol

Bach. Silvina Soria
Orientadora: MSc. Raquel Alonso
Laboratorio de Micología
Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería
UdelaR

Diciembre 2010

Agradecimientos

Al laboratorio de Micología por recibirme tan cálidamente y hacerme sentir como en mi casa.

A Raquel por toda su dedicación y paciencia en mi formación como así también por sus sugerencias en la redacción del manuscrito.

A Lina y Sandra por sus valiosos aportes de último momento en mi trabajo.

A Dinorah por ayudarme con los análisis estadísticos y a todos mis compañeros del laboratorio, Belén, Fernando, Anita, Rafael, Agustina, Flavia, Luis, Natalia, Lucía, Mariela, Dinorah, Eduardo, Susana, Carlos y Welker.

A Ana Clara Bianchi y Stella Reginensi por realizar la identificación molecular las bacterias.

A mi familia y amigos por tenerme paciencia y por su aliento constante.

INDICE

INTRODUCCIÓN

Antecedentes……1

Forestación en Uruguay…….1

Problemas fitosanitarios…….3

Control biológico……...6

Bacillus subtilis……..7

Burkholderia sp……..8

Objetivo general……8

Objetivos específicos……..9

MATERIALES Y MÉTODOS…….10

Obtención de muestras……10

Procesamiento de muestras…….10

Cultivos puros…….11

Identificación microscópica……12

Identificación molecular de *Fusarium circinatum*…….13

Obtención de bacterias……15

Identificación de bacterias……..15

Evaluación de la inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por bacterias vivas……15

Evaluación de la producción de y termoestabilidad de metabolitos bacterianos……...16

Análisis de datos…….16

RESULTADOS……..18

Síntomas presentes en plántulas…….18

Aislamientos de hongos asociados a síntomas……...19

Identificación de las especies de *Fusarium*……20

Identificación de bacterias……..25

Inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por bacterias vivas……...25

Inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por metabolitos bacterianos termoestables……...28

DISCUSIÓN……..30

CONCLUSIONES……34

BIBLIOGRAFÍA……..35

ANEXO……..42

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Forestación en Uruguay

En Uruguay se ha avanzado mucho en el desarrollo agro-forestal en los últimos años pero es un proceso aún en plena actividad y expansión. Dada las características privilegiadas del suelo, clima y topografía del país, el 88% del territorio es aprovechable y muy apto para diversas actividades como ser ganadería, agricultura y forestación [1]. El clima y características del suelo permiten un óptimo desarrollo de plantaciones de *Eucalyptus* en suelos de baja productividad y regimenes de corta duración [2]. Si bien existe una fuerte tradición ganadera en el país cada vez más ha ido tomando forma la práctica de la ganadería integrada con la forestación (silvopastoreo) [1]. El silvopastoreo, manejo integrado de árboles, ganado y pastos, produce ventajas comparativas importantes ya que su adecuado manejo conduce a la obtención de productos como madera de alta calidad, forraje y ganado de forma simultánea, intensiva y eficiente. El riesgo económico se reduce ya que de este sistema se obtienen múltiples productos de los cuales la mayoría ya tienen un lugar en el mercado, habiendo un ingreso relativamente constante por las ventas de ganado y árboles maderables. Al mismo tiempo, la producción del forraje provee nutrición mejorada para el crecimiento y producción del ganado [3]. Teniendo en cuenta los estudios de suelo que se han realizado a nivel nacional se ha logrado una mejora en el ordenamiento territorial para las distintas prácticas que se realizan en el campo. Es así que se han definido varias zonas productivas, cada una asociada a la zona de mayor aptitud para su práctica. La clasificación de las zonas hizo que algunas quedaran excluidas dada su limitada aptitud agrícola-pastoril, teniéndose en cuenta cuando se impulsó el desarrollo forestal de manera de no interferir con la producción agrícola-ganadera. Se promovió la plantación forestal en aquellas zonas menos aptas para cualquier otra práctica que fuera la producción forestal [1].

El sector forestal ha producido un incremento de las inversiones, exportaciones, desarrollo tecnológico y de mano de obra. La masa forestal plantada por impulso de la ley Nº 15939, promulgada en 1987, alcanzó unas 810.000 há. hasta el año 2008 principalmente compuesta por especies de *Eucalyptus* (70.3%), de *Pinus* (29 %) y de Salicáceas (0.7%) [4]. Dentro de las especies de *Eucalyptus* las más cultivadas son *E. grandis* y *E. globulus* y más recientemente *E. dunni*. De las especies de pino se

destacan *P. taeda* y *P. elliotti*, tanto por su adaptación al medio, sanidad, rápido crecimiento y características de la madera para pulpa, aserrío y debobinado [5]. A partir de la promulgación de la ley forestal el área forestada ha ido aumentando año tras año de manera exponencial (figura 1 y 2) debido en parte a los bajos precios de campos de prioridad forestal y a la construcción de fábricas de celulosa [6].

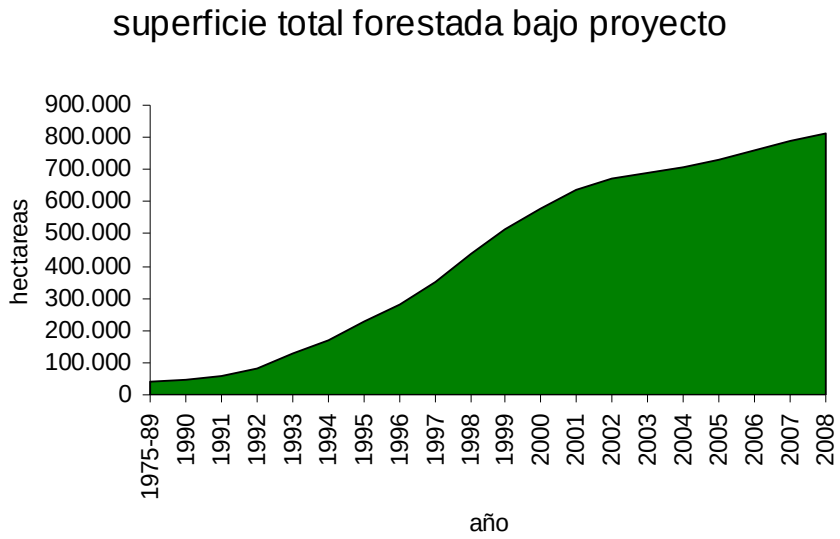


Figura 1. Evolución de la superficie forestada bajo proyecto de todas las especies.

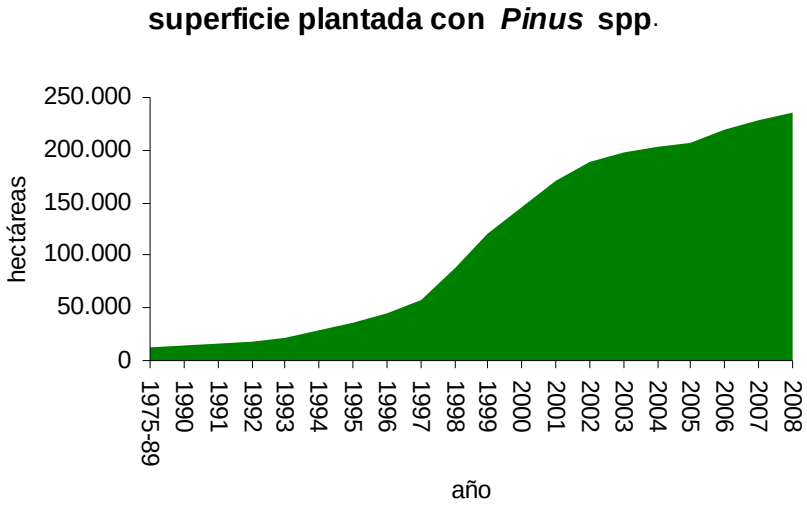


Figura 2. Superficie forestada de pinos bajo proyecto.

Considerando la creciente demanda de los productos madereros, tanto a nivel mundial como local, y el impulso para el desarrollo forestal, se prevé un incremento del área forestada y, en consecuencia, un aumento de los problemas fitosanitarios existentes, así como un mayor riesgo a la entrada y establecimiento de nuevas plagas y enfermedades en el país.

Hace ya algunos años el Laboratorio de Micología dio inicio al estudio de las comunidades de hongos endófitos y asociados a lesiones en plantaciones de *Eucalyptus* spp. [7-14] y más recientemente a problemas fitosanitarios asociados a *Pinus* [15].

Problemas fitosanitarios

Los problemas fitosanitarios imponen restricciones a la comercialización de los productos forestales por lo que es esencial el desarrollo de programas de protección forestal. Dado que las especies de *Pinus* constituyen una fuente de materia prima que ha visto incrementada su forestación, se considera de gran importancia realizar un relevamiento de los viveros donde se producen las plántulas para luego ser llevadas a campo. Dentro de las enfermedades más frecuentes que afectan a las plántulas de *Pinus* en vivero se encuentran el "damping off", provocado por *Phythium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. y "la seca de las puntas de pino" causado por *Diplodia* spp. y *Sphaeropsis* spp. [16].

Fusarium es un género de hongos de amplia distribución, con una gran diversidad de especies desde algunas que son saprofitas, patógenos débiles y hasta otras que resultan

importantes patógenos vegetales que pueden colonizar tanto la parte aérea como la parte subterránea de las plantas. Afectan de manera considerable a cultivos hortícolas, frutícolas y forestales ocasionando diversos tipos de enfermedades como manchas en hojas, pudrición de raíces y de la base del tallo, cancros en las plantas, pudrición de frutos, marchitamiento vascular [17]. Como consecuencia se disminuye tanto la cantidad como la calidad de la producción y al mismo tiempo se generan importantes pérdidas económicas [18] [46].

Dentro de los hongos fitopatógenos pertenecientes al género *Fusarium*, uno de los que ha tenido gran impacto a nivel mundial afectando distintas especies de pino es *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. Este hongo es el agente causal de una enfermedad cuarentenaria denominada "pitch canker" o cancro resinoso. Originalmente fue identificado como perteneciente al género *Fusarium* y asignado a la sección *Liseola* (Hepting & Roth 1946) [19]. Posteriormente se lo describió como *F. lateritium* (Snyder et al. 1949) asignándolo a la sección *Lateritium* [20]. Luego fue denominado como *F. moniliforme* var. *subglutinans* (section *Liseola*) (Dwinell & Phelps 1977 [21], Kuhlman et al. 1978) [22] y más tarde como *F. subglutinans* (Nelson et al. 1983) [23]. Finalmente en 1998 fue descrito como miembro del complejo *Gibberella fujikuroi* asignándole al estado asexual el nombre de *Fusarium circinatum* y al estado sexual *Gibberella circinata* [24].

Muchas especies de pinos son susceptibles a este patógeno y su presencia se ha registrado en más de 60 especies distintas aunque cada una de ellas con diferencias en el grado de susceptibilidad al mismo, siendo *P. radiata* la especie mas susceptible [17]. *Pinus taeda*, una de las especies más importantes para la forestación en nuestro país es susceptible a este hongo. La acción de este patógeno produce grandes pérdidas económicas en bosques naturales y en plantaciones. Es una enfermedad destructiva que conlleva a bajos rendimientos y altos niveles de mortalidad de plantines así como de árboles adultos [25]. En árboles adultos el síntoma más notorio es la producción de grandes cancros, tanto en el tronco principal como en las ramas laterales, con abundante exudado de resina. En ramas infectadas el exudado resinoso puede ocurrir en o cerca del sitio de infección. Otro síntoma característico es la decoloración y debilitamiento de las acículas lo que genera "flagging" de ramas terminales y laterales. El marchitamiento de las acículas se explica por la obstrucción del flujo de agua a través del xilema como consecuencia del exudado de resina que colapsa al tejido vascular. Esto puede conducir

a la muerte de la rama que en general tiene lugar desde el extremo hacia el sitio de infección. La infección de ramas individuales no conduce a la muerte del árbol a diferencia de múltiples infecciones que pueden generar una muerte progresiva en la canopia con posterior muerte del árbol. Muchas veces las acículas muertas (enrojecidas) permanecen adheridas a las ramas debido al efecto de la resina por largos períodos de tiempo [17] [26]. En plántulas en vivero los síntomas aéreos no se manifiestan hasta que el patógeno alcanza la zona del cuello, lo que se traduce en marchitamiento, pérdida de color (enrojecimiento) y secado de la acículas hasta la muerte de la plántula. La infección tanto de plantines como de árboles adultos se produce a través de conidios que se forman en cuerpos fructíferos denominados esporodoquios. La infección está asociada a lesiones o heridas en la corteza u otros tejidos en los árboles debido a que este hongo es incapaz de penetrar tejido intacto. En general las lesiones son causadas por daños ambientales debido a fuertes vientos y tormentas, por la acción de insectos o por la acción del hombre [26]. A su vez la infección puede desarrollarse en cualquier época del año y en cualquier etapa de crecimiento del árbol afectando tanto estructuras vegetativas (ramas, brotes, acículas, tallo, tronco) como reproductivas (estróbilo femenino, conos maduros y semillas) [17] [26]. La dispersión geográfica de este hongo ocurre a través del transporte de material infectado de pino (semillas o plántulas) y de madera infectada. Una vez que el hongo se ha establecido en una zona se dispersa fácilmente ya sea por agentes como el viento, agua o insectos. Esta enfermedad es originaria del este de Estados Unidos [27] pero la presencia del patógeno se ha extendido a México, Sud África, Japón, España y Chile [28-31]. Recientemente, en Uruguay fue detectada su presencia en plantines de *P. taeda* en vivero [32]. La distribución de *F. circinatum* es variable, debido a diferencias en las distintas regiones con condiciones climáticas particulares, presencia de vectores que ayudan a la dispersión de las esporas y a los agentes causantes de lesiones necesarios para el establecimiento del patógeno [17].

Control biológico

Según Cook and Baker (1980) el control biológico se puede definir como la reducción en la cantidad de inóculo o enfermedad, producida por la actividad de un patógeno, debido a la acción de uno o varios organismos [33].

Las enfermedades producidas por hongos son muy frecuentes en los viveros donde el control químico de los patógenos es la práctica más frecuente. Una alternativa al uso de agroquímicos es el control biológico, esto es, la utilización de enemigos naturales o el aprovechamiento de compuestos derivados de su metabolismo para controlar el efecto de agentes patógenos. La utilización de agentes de control biológico puede reducir las cantidades de fungicidas químicos y con ello los desechos tóxicos y problemas que trae su aplicación tanto para la salud humana como para otros organismos [34].

El uso desmedido de productos químicos ha dañado el medio ambiente y ha inducido resistencia en los patógenos. De aquí es que se desprende la necesidad de desarrollar otras estrategias para el control de fitopatógenos siendo el control biológico una buena alternativa o complemento para lograr una menor incidencia de estos productos [35].

El modo de acción de los microorganismos antagonistas es variado. La supresión de una enfermedad, debido a un patógeno dado, puede ocurrir por interacción directa del microorganismo antagonista frente al patógeno o, por acción indirecta que involucra el desarrollo de resistencia en la planta hospedadora. El antagonismo microbiano implica la interacción directa entre dos microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico. Dentro de la interacción directa se distinguen tres estrategias diferentes: antibiosis, parasitismo y competencia por nutrientes. La antibiosis consiste en la producción por parte de un microorganismo de metabolitos secundarios que resultan tóxicos para otros microorganismos. Esta estrategia es responsable de la actividad de muchos agentes de control biológico como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. y *Trichoderma* spp. Se han descrito y documentado una gran cantidad de moléculas y su función como supresoras de patógenos de plantas [36-38]. Si bien los antibióticos son las moléculas más conocidas con efecto antagónico también existen otras muy efectivas como son las enzimas con capacidad de degradar la pared celular, bacteriocinas y compuestos volátiles con actividad antifúngica. Una determinada cepa de control biológico produce muchos metabolitos secundarios distintos cada uno con un efecto diferente y efectivo contra distintos hongos fitopatógenos [33].

El parasitismo, caso particular de predación, es una interacción biológica entre dos organismos (parásito – hospedador) que consiste en el consumo parcial del hospedador por parte de la presa (parásito). En este caso involucra el reconocimiento específico entre el antagonista y el patógeno y varios tipos de enzimas degradadoras de la pared celular de manera de permitirle al parásito el acceso a las hifas del patógeno [33].

La competencia por nutrientes es un fenómeno natural que ocurre en las poblaciones y que tiende a regular la dinámica de las poblaciones que comparten un mismo nicho ecológico y las necesidades por un recurso cuando este está limitado [33].

Bacillus subtilis

Muchos estudios han mostrado que las especies pertenecientes al género *Bacillus* son capaces de producir un gran número de sustancias con capacidad antimicrobiana, incluyendo antibióticos, así como también metabolitos antifúngicos que protegen a las plantas de la infección por hongos [39-40]. Estas bacterias son de fácil obtención dado que se caracterizan por estar ampliamente distribuidas en el suelo, frecuentemente aparecen asociadas a las raíces de las plantas. También son tolerantes a altas temperaturas y de rápido crecimiento en cultivos líquidos. Son consideradas agentes de control biológico seguro dado que no producen enfermedades en las plantas ni en animales y además su potencial como agentes controladores es muy elevado [40]. En particular, *Bacillus subtilis* es una de las más importantes ya que posee la capacidad de producir un amplio espectro de antibióticos (más de 70) y además de metabolitos con actividad antifúngica y/o antimicrobiana [39]. Debido a esto ha sido considerada muy efectiva en el control de diversas enfermedades de plantas transmitidas a través del suelo [41]. También ha sido demostrada su actividad antagónica frente a muchas especies de hongos fitopatógenos teniendo efectos supresores tanto in vitro como in vivo sobre especies de *Alternaria*, *Monilia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytium*, *Phytophthora*, *Rhizotocnia* [39][42].

Debido a estas razones es que *B. subtilis* es un agente de control biológico ideal y su utilización puede considerarse como método alternativo o adicional para contrarrestar la aplicación de productos químicos para el control de patógenos vegetales.

Burkholderia sp.

Así como *B. subtilis* puede actuar como microorganismo antagonista, otros estudios han mostrado que especies de *Burkholderia* también poseen dicha capacidad. En particular, *B. cepacia* es capaz de producir una gran cantidad de compuestos con actividad antifúngica, principalmente antibióticos, así como otros metabolitos que suprimen la acción de fitopatógenos del suelo. Muchos de sus metabolitos han sido aislados y caracterizados verificándose así su efecto inhibitorio sobre distintos agentes patógenos de plantas como hongos, bacterias y levaduras [43]. En particular, sobre hongos de

especies pertenecientes a *Pythium, Botrytis, Rhizotocnia, Fusarium*. [44-45]. La diversidad de las características bioquímicas que presenta dicha bacteria ha hecho que se considere un complejo constituido por nueve "genomovar" [44]. No sólo es efectiva como agente de control biológico sino que también se ha visto que tiene potencial como agente de biorremedación ya que puede degradar herbicidas y pesticidas. Esta bacteria es capaz de utilizar compuestos presentes en diversos agroquímicos como fuente de carbón y energía [44].

B. cepacia es un microorganismo ubicuo del suelo por lo que resulta un agente de control biológico de fácil obtención. Dadas sus características *B. cepacia* ha sido utilizada para proteger distintos cultivos frente al ataque de fitopatógenos y constituye una alternativa a la utilización de compuestos químicos [44].

Debido a la importancia que a nivel mundial ha alcanzado *F. circinatum* y teniendo en cuenta la importancia del sector forestal en el país, se considera fundamental ahondar en la investigación de las enfermedades de plántulas de *Pinus taeda.*

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es detectar la presencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus taeda* en viveros forestales y seleccionar organismos antagonistas para su biocontrol.

Objetivos específicos

1. Realizar aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* a partir de tejidos de raíz y de la zona del cuello del tallo de plántulas de *Pinus* con síntoma de debilitamiento.
2. Caracterizar las cepas de *Fusarium circinatum* morfológicamente, verificar su identidad por métodos moleculares.
3. Evaluar el efecto inhibitorio de bacterias saprófitas sobre *F. circinatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Plántulas de *Pinus taeda* que presentaban síntoma de marchitamiento y/o lesiones a nivel del cuello fueron proporcionadas por dos viveros forestales (tabla 1).

Se procesaron un total de 23 plántulas entre los dos viveros.

Tabla 1. Viveros que proporcionaron los plantines para analizar.

Vivero	Procedencia semillas de *P. taeda*	Sustrato
Dpto Florida	EEUU	turba Canadá
Dpto Tacuarembó	EEUU	turba Canadá

Procesamiento de muestras

En primer lugar las plántulas fueron observadas macroscópicamente a nivel de las acículas, cuello y raíz para determinar el grado de afección de las mismas. Luego se observaron bajo la lupa para poder observar la presencia de síntomas tales como cancros, exudados resinosos y la presencia de fructificaciones de hongos. Se registraron las características de cada uno de ellos como ser color y cantidad de acículas, y color de la zona de cuello (región entre raíz y tallo). Posteriormente se procedió al lavado de la raíz con agua corriente con el fin de eliminar la turba en la que se encontraban. Por último se secaron en papel y se fotografiaron.

En segundo lugar los tejidos de las regiones del cuello y raíz fueron cortados en pequeñas secciones, de 3 mm aproximadamente cada una, y esterilizadas superficialmente por separado para eliminar organismos epífitos, esporas o fragmentos de micelio. Las secciones fueron inmersas durante 1 minuto en etanol al 80%, 2 minutos en hipoclorito de sodio al 2% y finalmente se hicieron dos lavados con agua destilada estéril.

Luego las secciones se secaron cubriéndolas con papel absorbente estéril.

Al término de la esterilización las distintas secciones se colocaron en placas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) acidificado. Se sembraron 10 secciones por placa para cada tejido analizado. Se rotularon las cajas y se incubaron durante 5 días a 25ºC.

Una vez que se visualizó la emergencia de hongos asociados a los tejidos analizados se anotaron características macroscópicas incluyendo aspecto de la colonia, color del micelio aéreo y color del reverso de la colonia. Posteriormente se contabilizaron y se les asignó un código (Fc) para su manipulación. Aquellos hongos que eran morfológicamente iguales se agruparon bajo el mismo código. Además su presencia se documentó con fotografía digital.

Para el presente trabajo se consideraron solamente los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium*.
Bacterias emergentes de los distintos segmentos analizados y que mostraban efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos fueron aisladas y transferidas a medio de cultivo TSA (Tripton Soya Agar), favorable para su desarrollo, con el fin de evaluar su actividad como posibles controladores biológicos de hongos patógenos.

Cultivos puros

Una vez finalizada la agrupación de los distintos hongos obtenidos de acuerdo a características macroscópicas se procedió a la obtención de cultivos puros de cada uno de ellos para la identificación en base a características micromorfológicas. Para ello los hongos emergentes se pasaron a cajas de Petri de 4.5 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo PDA. También se inocularon en medio de cultivo CLA (Carnation Leaf Agar) siendo este medio favorable para la formación de esporodoquios y, en medio de SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) que favorece la formación de hifas enrolladas características de *F. circinatum*.

De los cultivos puros obtenidos en PDA se tomaron cuatro discos con un sacabocado estéril. Estos discos fueron colocados en crio tubos estériles conteniendo glicerol al 10% para luego ser conservados a -80ºC y así mantenerlos en condiciones adecuadas para su posterior identificación.

Identificación microscópica

Para la identificación de los distintos hongos a nivel de género y especie se tomaron en cuenta las siguientes características micromorfólogicas: tipo de célula conidiógena (monofiálides o polifiálides), tamaño y morfología de macro y microconidios, disposición de los microconidios, en cadenas o falsas cabezas, presencia y/o ausencia de clamidosporas, hifas estériles enrolladas [46].

Se realizaron preparados para observar al microscopio óptico, tomando de cada colonia una pequeña muestra, bajo condiciones asépticas, utilizando cinta scotch que se colocó entre un porta y un cubre objeto con una gota de lactofenol-azul de algodón.

Para el caso de aquellos hongos que habían producido esporodoquios en CLA, se tomó una pequeña muestra con aguja del mismo bajo la lupa y esta se colocó entre un cubre y porta objeto con una gota de lactofenol y se observó al microscopio óptico.

La identificación en medio de cultivo SNA se realizó a partir de cultivos monospóricos (Hansen & Smith 1932) que se obtuvieron de la siguiente manera:

1. Preparación de una suspensión de esporas en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril a partir de micelio de siete días.
2. Conteo del número de esporas presentes en una gota de la suspensión previamente preparada. Esto se realizó en microscopio óptico bajo un aumento de 100X y se consideró adecuado entre 7-10 esporas por campo.
3. La suspensión (10 ml) se volcó sobre cajas de Petri de 9cm de diámetro conteniendo medio Agar-Agua 2%. Se hicieron suaves movimientos para que las esporas quedasen adheridas al medio y finalmente se descartó el exceso de suspensión.

Las cajas de Petri se colocaron inclinadas en una caja forrada de manera de evitar la incidencia lumínica y se incubaron a 25ºC durante 24hs.

Al siguiente día se realizaron los cultivos monospóricos bajo lupa. Con una aguja delgada se tomó una espora germinada y se colocó en caja de Petri de 4.5cm de diámetro conteniendo medio SNA. Se tomaron varias esporas de cada muestra. Finalmente las placas se incubaron durante 7-12días a 25ºC.

A partir de los cultivos monospóricos se observaron las características microscópicas de las cepas y de aquellas identificados como *F. circinatum* se tomaron cuatro discos con

un sacabocado estéril para conservar el micelio en crio tubos con glicerol al 10% a una temperatura de -80ºC.

Identificación molecular de *F. circinatum*

La identificación de *Fusarium circinatum* se verificó mediante técnicas moleculares a través de la amplificación de la región IGS (espacio intergénico del ADNr) de 360 pares de bases con la utilización de los primers específicos CIRC1A y CIRC4A (tabla 2) [47].

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de *F. circinatum* y secuencia de la región IGS

Primer	Secuencia	Secuencia blanco
CIRC1A	5`CTTGGCTCGAGAAGGG	IGS forward
CIRC4A	5`ACCTACCCTACACCTCTCACT	IGS reverse

Para ello primero se realizó la extracción de ADN de acuerdo al protocolo de Lee & Taylor (1990) a partir de cultivos monospóricos puros de *F. circinatum*. Se raspó el micelio de cada cepa con un bisturí estéril y luego se agregó tampón de lisis (Tris HCl pH= 8.0, EDTA N_2, SDS) para realizar la lisis mecánica con machacadores de plástico estériles. Después de obtener una solución homogénea se agregó proteinasa k al 2% y se incubó la mezcla durante 30 minutos a 60ºC. Posteriormente se agregó NaCl y CTAB 10X y se incubó a 65ºC durante 10 minutos. Seguido a esto se agregó cloroformo isoamílico y se incubó en freezer a -20ºC durante 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante. A este se le adicionó acetato de Na y se incubó en freezer a -20ºC durante 30 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se adicionaron 0.55 volúmenes de isopropanol. Luego se incubó a -20ºC durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó etanol al 70% para lavar el pellet. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante 5 minutos y luego se descartó el etanol. Se dejó secar el pellet durante 1 hora a 50ºC en baño seco y después se resuspendió con agua mQ a 60ºC. Finalmente se agregó RNAsa y se incubó a 37ºC durante 60 minutos. Se almacenó a -20ºC.

Las condiciones de PCR adecuadas se obtuvieron luego de una serie de pruebas en las que no se produjo producto de amplificación obteniéndose luego con la desnaturalización de la doble hebra a 94ºC durante180 segundos seguida de 35 ciclos a

94 ºC por 35 seg; 66 ºC por 55 seg; 72 ºC por 50 seg y una extensión final a 72 ºC durante 5 minutos [47].

Finalmente el producto de PCR obtenido fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 2%, revelado con bromuro de etidio 10µg/µl y visualizado con luz UV.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl y las condiciones utilizadas para 1 tubo se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Se muestran los reactivos y sus respectivos volúmenes utilizados para la amplificación de la región IGS de *F. circinatum*

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10X con KCl	2.5
dNTPs	2.5
$MgCl_2$ 50mM	0.75
Primer CIRC1A [10µM]	0.75
Primer CIRC4A [10µM]	0.75
Taq DNA Polymerase	0.125
H_20	17.12
DNA	0.5

Para determinar la temperatura de hibridación de los primers se realizó un gradiente de temperatura desde 56 ºC a 68 ºC (56 ºC, 57.1 ºC, 58.3 ºC, 59.4 ºC, 60.5 ºC, 61.5 ºC, 62.5 ºC, 63.5 ºC, 64.6 ºC, 66.7 ºC, 66.9 ºC y 68 ºC) de las cuales se seleccionaron para la amplificación las correspondientes a 57.1 ºC, 60.5 ºC, 63.5 ºC y 66.9 ºC. El producto de amplificación de una de las cepas fue secuenciado con los mismos primers y luego las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa MEGA 4 y comparadas mediante Blast con las secuencias registradas en la base de datos del GenBank.

Obtención de bacterias

Las distintas bacterias fueron obtenidas a partir de los segmentos de tejidos de las plántulas inoculadas en medio de cultivo. Aquéllas en las que se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento de las colonias fúngicas adyacentes, fueron aisladas a un medio de cultivo específico para bacterias (TSA). Para obtener colonias puras se realizó un estriado de estos cultivos y las colonias aisladas fueron separadas y utilizadas posteriormente para evaluar su efecto inhibitorio sobre el patógeno. Se aislaron cinco

cepas bacterianas (B1, B2, B3, B4 y B5). Cuatro de estas cepas fueron obtenidas a partir de los segmentos de raíz de los plantines procedentes del vivero de Tacuarembó mientras que B5 se aisló a partir de tejidos de plantas jóvenes provenientes de una plantación.

Identificación de bacterias

La identificación se realizó en base a características morfológicas y moleculares. Primero se realizó una tinción de Gram para determinar si eran Gram + o Gram – y luego se observó la morfología para evaluar si eran bacilos, cocos, espirilos.

La identificación a nivel de especie de 4 cepas (B1, B2, B3 y B4) se realizó a través de métodos moleculares en el laboratorio de Tecnología de los alimentos de Facultad de Agronomía a cargo de Stella Regenensi. En el caso de B5 se realizó la extracción y amplificación del ADNr 16S en el Laboratorio de Bioingeniería de Facultad de Ingeniería y el producto de amplificación fue secuenciado en MACROGEN (Korea). Para la amplificación y secuenciación de B5 se utilizaron los primers 27 F, 518 F y 1492 R.

Evaluación de la inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por bacterias vivas

Para evaluar la actividad antagónica de las distintas cepas bacterianas frente a *F. circinatum*, se colocó, en el centro de placas de Petri de 9cm de diámetro que contenían medio de cultivo PDA, un disco de micelio de 7 días. En cada una de las esquinas de un cuadrado imaginario se inoculó en un punto con un ansa estéril una pequeña muestra de cada cepa bacteriana. Como testigo se utilizaron placas conteniendo solo el inóculo del hongo (sin enfrentamiento con bacterias). Se realizaron cinco réplicas para los enfrentamientos mientras que los testigos se hicieron por duplicado. Se incubó a 25ºC y se tomaron medidas del halo de inhibición durante 5 días. Se analizaron cuatro cepas de *Fusarium circinatum* (Fc2052, Fc 2053, Fc 2054 y Fc 2057).

Evaluación de producción y termoestabilidad de metabolitos bacterianos

Para determinar la estabilidad térmica de los metabolitos producidos por las distintas cepas bacterianas se realizaron cultivos líquidos de las bacterias y se autoclavaron. Para ello, colonias de cada bacteria (seis ansadas) fueron transferidas a Erlenmeyers de 250 ml que contenían medio de cultivo líquido PDB (Caldo Papa Dextrosa) e incubadas en agitador mecánico durante 7 días a 28ºC y 180 rpm. Luego muestras de 10 ml de cada

caldo fermentado fueron transferidas a Erlenmeyers de 250 ml que contenían 90 ml de PDA. Esto se esterilizó en autoclave durante 16 minutos a 121ºC y 1 atm de presión. Posteriormente se homogeneizaron y se colocaron 20 ml de cada suspensión en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio se colocó en el centro de cada placa un disco de micelio, extraído con un sacabocado estéril del borde de la colonia de 7 días, de la cepa de *F. circinatum* a analizar. Se evaluaron cuatro cepas de *F. circinatum* (Fc2052, Fc 2053, Fc 2054 y Fc 2057). Como testigos se utilizaron placas que contenían sólo el patógeno y el medio de cultivo (PDA) sin la incorporación de los metabolitos. Se realizaron tres réplicas para cada caso. Luego de incubarlos por 5 días se registraron las medidas de crecimiento del micelio desde el centro de la colonia del hongo hacia el borde (radio de la colonia) de crecimiento durante 4 días [48]. Se tomaron dos medidas perpendiculares en, cada caso, que fueron promediadas.

Análisis de datos

Se calculó el porcentaje de especies de *Fusarium* obtenidas como:

Nº de aislamientos para cada especie de *Fusarium*/ Nº total de aislamientos de *Fusarium**100.

También se calculó el Nº de aislamientos del total de especies de *Fusarium* en raíz y tallo / Nº total de aislamientos de *Fusarium**100 y se calculó el Nº de aislamientos de cada especie de *Fusarium* en raíz y cuello en relación al Nº total de aislamientos de *Fusarium* spp.*100.

Se calcularon las velocidades de crecimiento de cada una de las cepas de *F. circinatum* analizadas graficando el diámetro de la colonia (mm) en función del tiempo (días) para cada una de las réplicas, correspondiendo la pendiente de cada curva a la velocidad de crecimiento de cada réplica. Para determinar si existen diferencias significativas en cuanto a la inhibición en la velocidad de crecimiento de *F. circinatum* por la actividad de metabolitos bacterianos termoestables de las diferentes cepas, se realizó el análisis de varianza de una vía (One Way ANOVA) en el programa Sigma Stat 3.5. El análisis se hizo para cada cepa y sus respectivos controles y tratamientos. También se compararon los controles de cada cepa para evaluar diferencias en la velocidad de crecimiento entre ellas.

El porcentaje de inhibición en el crecimiento de cada cepa respecto a los metabolitos bacterianos se calculó como:

% inhibición= ((prom del diámetro de la colonia control – promedio del diámetro de la colonia con cada tratamiento) / (prom del diámetro de la colonia control))*100

RESULTADOS

Síntomas presentes en plántulas

Los plantines analizados se caracterizaron por presentar síntomas tanto a nivel de las acículas como del tallo (figura 3). Las acículas del extremo del tallo mostraban una notoria decoloración que tomaba tonos de marrón y rojizo con posterior caída de las mismas. En el tallo, a nivel del cuello se observó un anillamiento que obstruye el transporte de agua a través del xilema con el consecuente marchitamiento del plantin. En algunos plantines también se observaron en esas lesiones cuerpos fructíferos globosos y de color salmón denominados esporodoquios (figura 4).

Figura 3. Plantines de *Pinus taeda* con síntoma de marchitamiento.

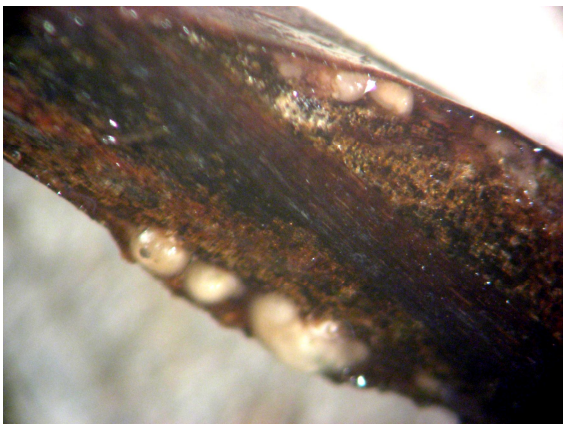


Figura 4. Lesión a nivel del cuello en plántula de *Pinus taeda* con presencia de esporodoquios.

Aislamientos de hongos asociados a síntomas

De un total de 23 plántulas analizadas se obtuvieron 156 aislamientos, de ellos 126 correspondientes a especies de *Fusarium* y 30 a otros géneros (figuras 5 y 6).

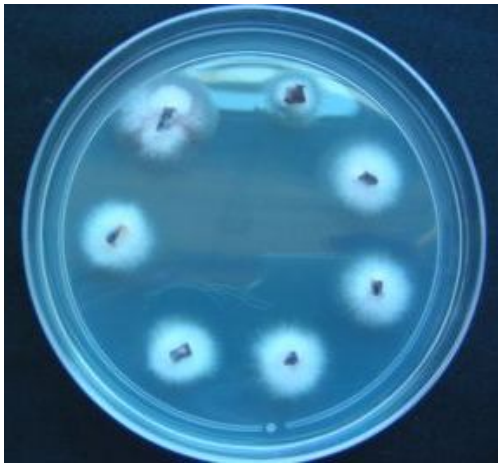


Figura 5. Hongos emergentes de las secciones de cuello incubadas en medio de cultivo PDA a 25ºC.

Figura 6. Hongos emergentes de las secciones de raíz incubadas en PDA a 25ºC.

Las especies de *Fusarium* que se encontraron fueron *F. circinatum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Sus porcentajes de aislamientos se muestran en la figura 7.

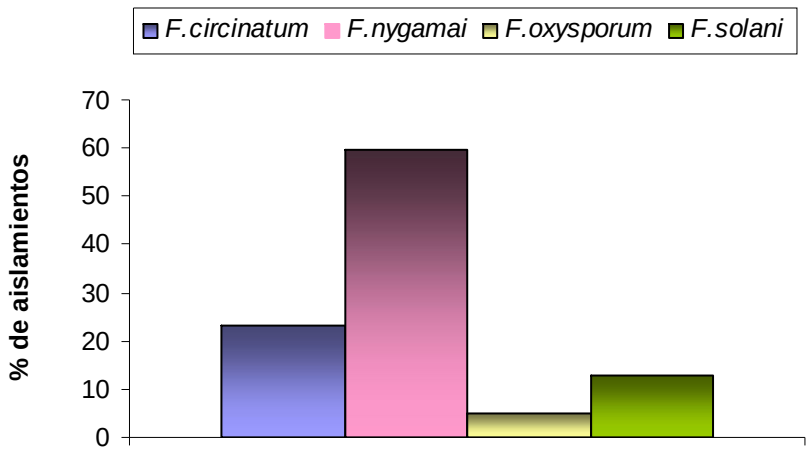


Figura 7. Porcentaje de aislamientos de cada especie de *Fusarium* del total de aislamientos del género.

De los órganos analizados el que mostró mayor número de aislamientos de *Fusarium* fue el tallo (73%) mientras que en la raíz fue menor (23%) (figura 8). Por otro lado, tanto en la raíz como en el tallo, la especie que tuvo mayor porcentaje de aislamientos fue *F. nygamai*, 44.1 y 65.2% respectivamente (figura 9).

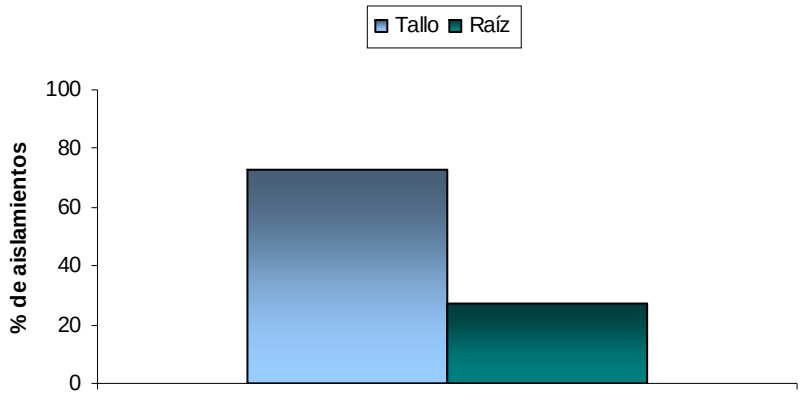


Figura 8. Porcentaje de aislamiento del total de las especies de *Fusarium* en los distintos órganos analizados.

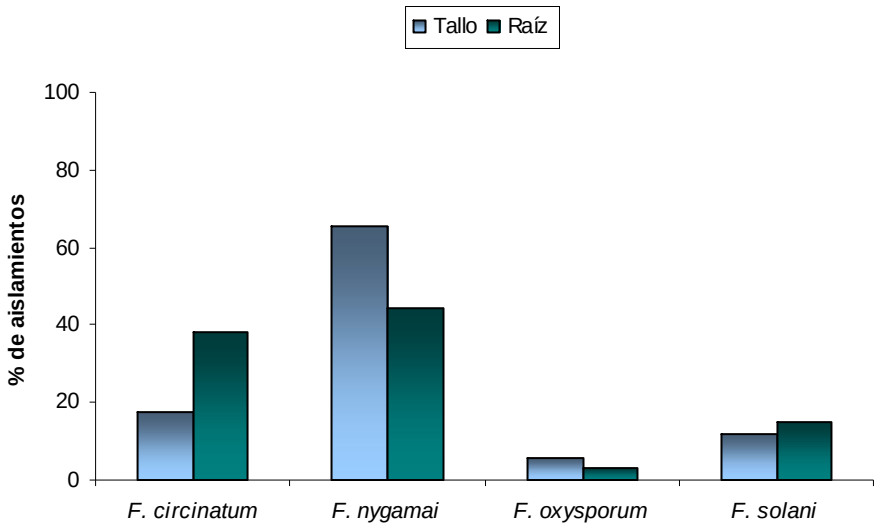


Figura 9. Porcentaje de aislamientos de cada especie de *Fusarium* aisladas de cada órgano analizado.

Identificación de las especies de *Fusarium*

Las cepas identificadas como *F. circinatum* (figuras 10, 11 y 12) presentaban las siguientes características (tabla 3):

Tabla 3. Características de *F. circinatum*

Caracteres considerados	**Descripción**
Micelio aéreo	Aspecto algodonoso, blanco-rosa-violeta
Reverso de la colonia	Pigmentos rosa-violeta oscuro
Célula conidiógena	Muchas polifiálides ramificadas
Macroconidios	Multiseptados, cilíndricos, delgados.
Microconidios	Disposición en cabezuelas, sin septos, obovoides
Clamidosporas	No produce
Hifas estériles	Hifas enrolladas (“hifas coiled”) típicas en SNA
Región IGS del RNAr	Producto de amplificación por PCR de 360 pb

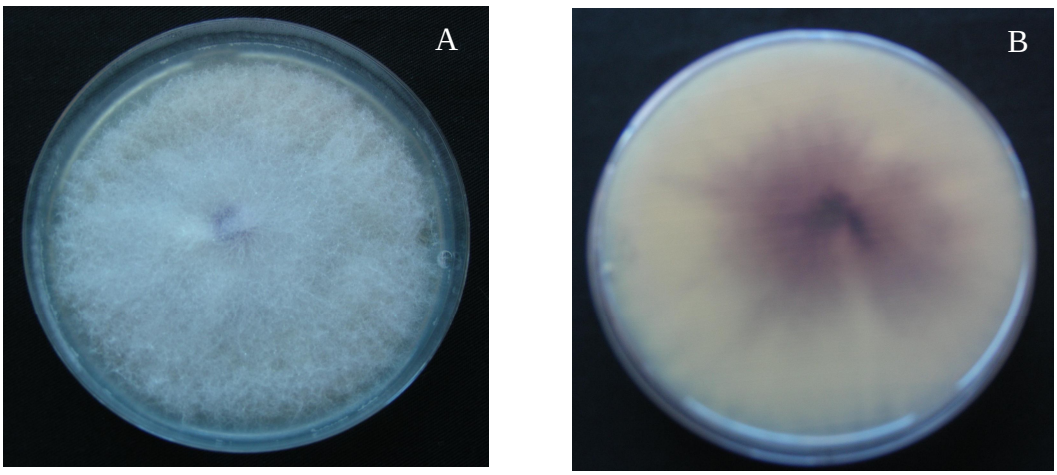


Figura 10. Aspecto y coloración del micelio aéreo (A) y reverso (B) de la colonia de *F. circinatum* en medio de cultivo PDA.

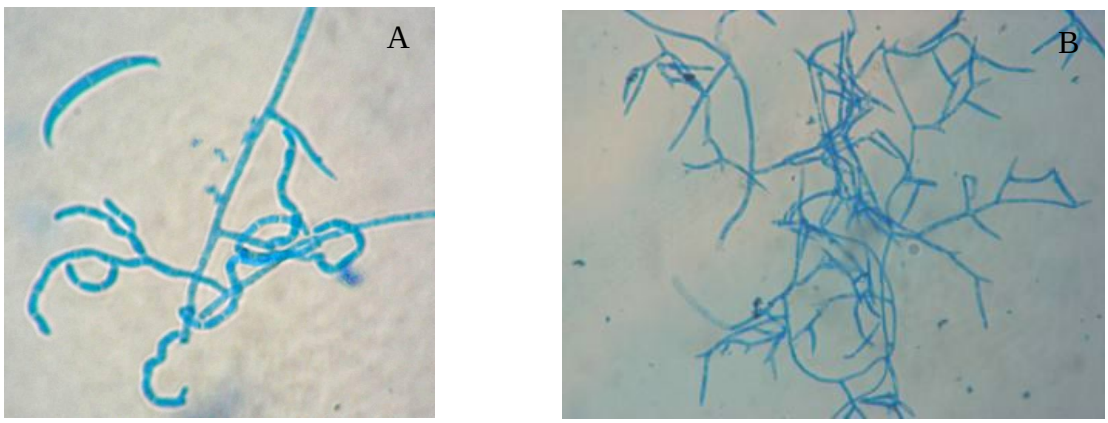


Figura 11. A) Hifas estériles enrolladas características de *F. circinatum* junto a un macroconidio. B) Polifiálides.

Los productos de amplificación (figura 12) correspondientes a las distintas cepas de *F. circinatum* se obtuvieron a distintas temperaturas en el gradiente de temperatura utilizado. Algunas cepas amplificaron a 57.1 ºC y 60.5 ºC mientras que otras lo hicieron a 63.5 ºC y 66.9 ºC.

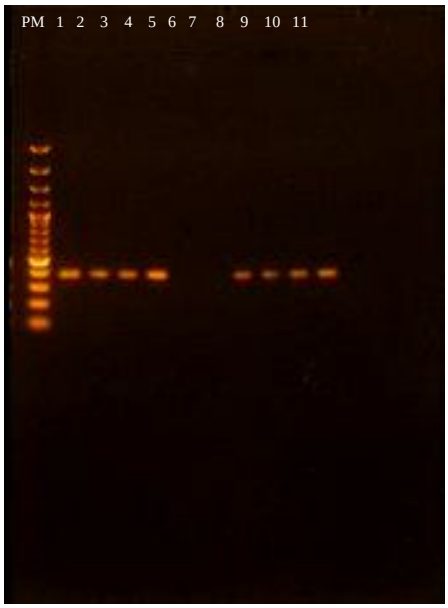


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones de 360 pb de la región IGS de *F. circinatum* correspondiente a tres cepas. Carriles: PM Marcador de peso molecular, 1 y 2 Cepa Fc 32, 3 y 4 cepa Fc 45, 5 y 6 cepa *F. nygamai*, 7 y 8 control positivo, 9 y 10 cepa Fc 2057 y 11 control negativo

En la figura 12 se observan los productos de amplificación de 3 cepas de *F. circinatum*. Todas las cepas amplificaron a 57.1 ºC y 60.5 ºC. En los carriles 5 y 6 la ausencia de banda se explica por la cepa utilizada que correspondió a *F. nygamai*. Con ello se aseguró que no se produjeran falsos positivos. El control negativo corresponde al mix de PCR sin ADN (carril 11)

Para el caso de las restantes cepas de *F. circinatum* su identificación también fue verificada por PCR obteniéndose en todas el amplicón de 360pb. Si bien todas amplificaron la región deseada, algunas lo hicieron a temperatura de 57.1 ºC y 60.5 ºC del gradiente de annealing utilizado mientras que otras a 63.5 ºC y 66.9 ºC. Estas últimas también amplificaron a las temperaturas más bajas.

La secuenciación de uno de los productos de amplificación y posterior alineamiento en el Blast de la secuencia obtenida mostró similitud con *F. circinatum.*

Por otro lado aquellas colonias cuyas características macromorfológicas (figura 13) y micromorfológicas (figura 14) eran semejantes a las descritas por Leslie & Summerel, (2006) para *Fusarium nygamai* (tabla 4) fueron identificadas como tales.

Tabla 4. Características de *F. nygamai*

Caracteres considerados	**Descripción**
Micelio aéreo	Blanco y algodonoso
Reverso de la colonia	Pigmentos rosa
Célula conidiógena	Muchas monofiálides, pocas polifiálides
Macroconidios	De pared delgada, cilíndricos, rectos, finos multiseptados, generalmente 3 septos
Microconidios	Ovales, sin septos pero ocasionalmente 1 septo. Disposición en cadenas cortas o falsas cabezas
Clamidosporas	En el micelio aéreo, abundancia varía según la cepa, individuales o en cadenas, terminales o intercalares

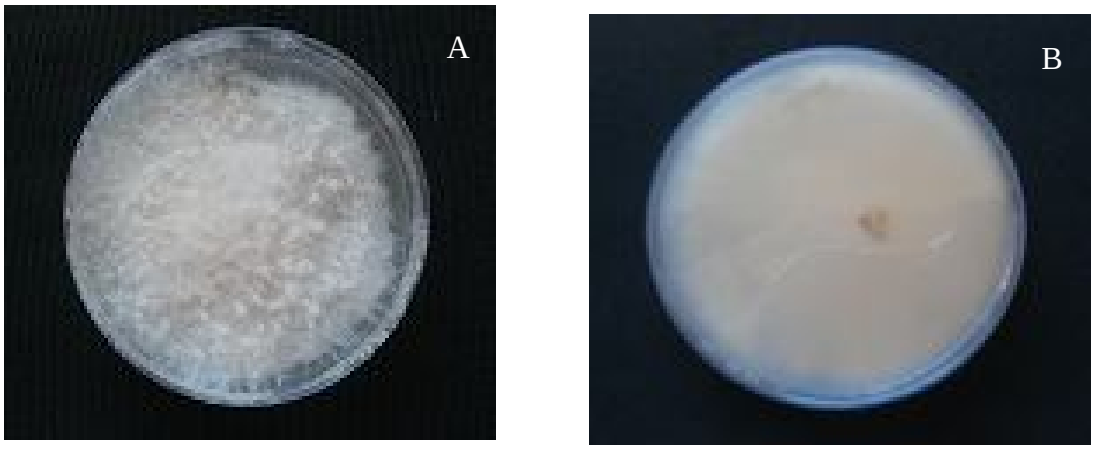
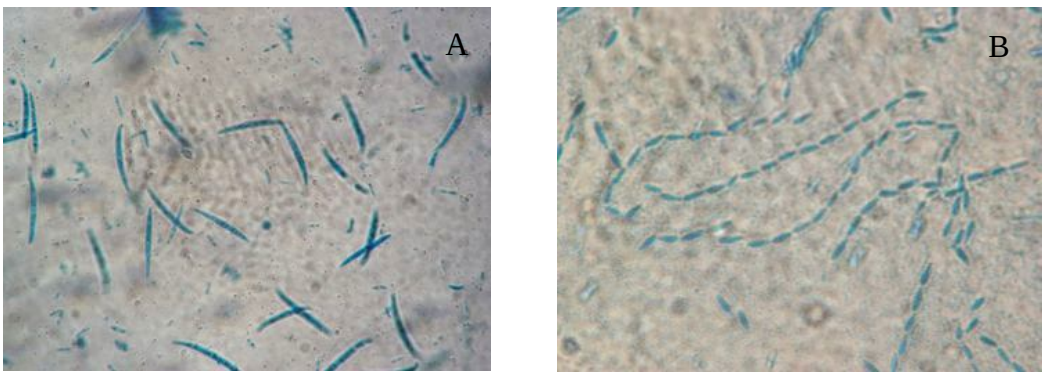


Figura 13. *F. nygamai*. Aspecto y coloración del micelio aéreo (A) y reverso (B) de la colonia en medio de cultivo PDA.



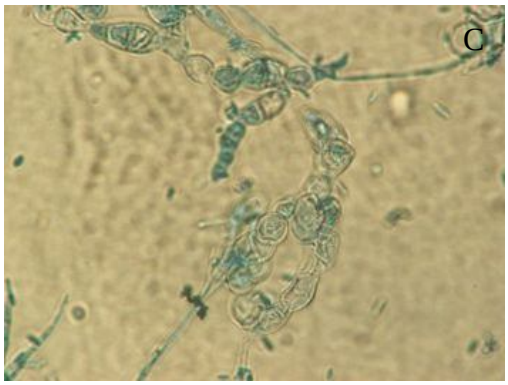


Figura 14. Cadenas de microconidios (A), clamidosporas (B) y macroconidios (C), estructuras típicas de *F. nygamai.*

Finalmente dadas las características macromorfológicas y micromorfológicas, las especies identificadas como *Fusarium solani* (tabla 5) y *Fusarium oxysporum* (tabla 6) presentaban las siguientes características (Leslie & Summerel, 2006) [46]

Tabla 5. Características de *F. solani*

Caracteres considerados	**Descripción**
Micelio aéreo	Aspecto algodonoso, blanco a crema
Reverso de la colonia	Con o sin pigmento violeta
Célula conidiógena	Muchas monofiálides largas
Macroconidios	Multiseptados (5 a 7 septos), anchos, rectos y robustos
Microconidios	Disposición en falsas cabezas, elipsoides, reniformes, con ningún 1 u ocasionalmente 2 septos
Clamidosporas	Abundantes, intercalares o en ramas terminales; solas o de a pares

Tabla 6. Características de *F. oxysporum*

Caracteres considerados	**Descripción**
Micelio aéreo	Flocoso, blanco a violeta pálido
Reverso de la colonia	Con o sin pigmento violeta pálido a magneta oscuro
Célula conidiógena	Muchas monofiálides cortas
Macroconidios	Multiseptados (3 septos), de cortos a mediana longitud, rectos o curvados, finos y de pared delgada
Microconidios	Disposición en falsas cabezas, ovales, elípticos o reniformes, sin septos
Clamidosporas	Abundantes, solitarias o en pares, en grupos o cadenas cortas, terminales o intercalares

Identificación de bacterias.

La observación microscópica mostró una morfología bacilar en todas las bacterias aisladas. De la tinción de Gram se constató que eran bacterias Gram negativas.

De un total de cinco cepas bacterianas aisladas, cuatro de ellas se identificaron como *Bacillus subtilis* en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía.

Para el caso de la bacteria B5, la alineación de la secuencia de la región 16S obtenida produjo una correspondencia de 94% con *Burkholderia* sp.

Inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por bacterias vivas

El screening de las cepas de *B. subtilis* en cuanto a su posible actividad antagónica frente a las cepas de *F. circinatum* mostró que todas inhibieron el crecimiento del micelio fúngico deteniendo su avance a varios milímetros (figura 15 y 16).

La observación al microscopio de las hifas del hongo provenientes de la zona de interacción mostró hifas con hinchamientos, deformaciones, vacuoladas y sin contenido (figura 17) en comparación a las hifas normales (figura 18).

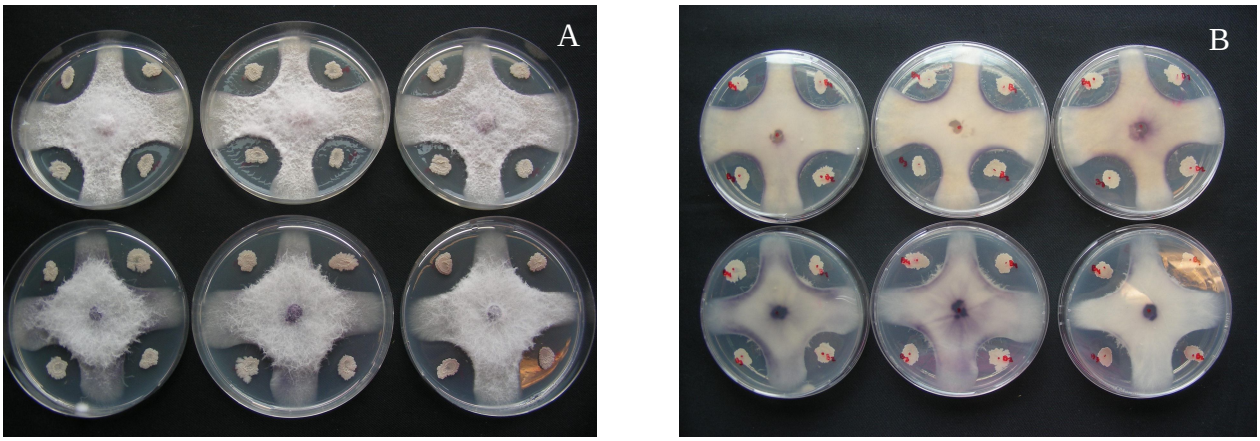
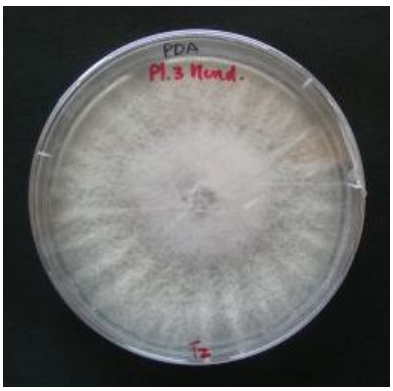


Figura 15. Halo de inhibición de la cepa fúngica Fc2053 (superior) y Fc 2057 (inferior) debido a bacterias vivas. A) Frente de las colonias, B) reverso de las colonias.

Cepa Fc 2057. Testigo.



Cepa Fc 2053. Testigo.

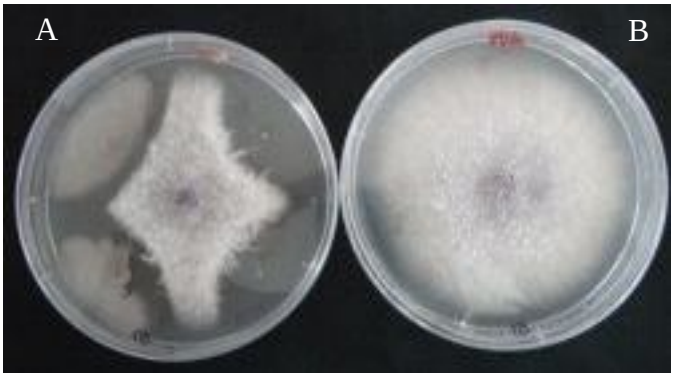


Figura 16. Halo de inhibición del crecimiento la cepa Fc2053 respecto a las bacterias B1, B4 y B5. A) Frente de la colonia, B) Frente del control

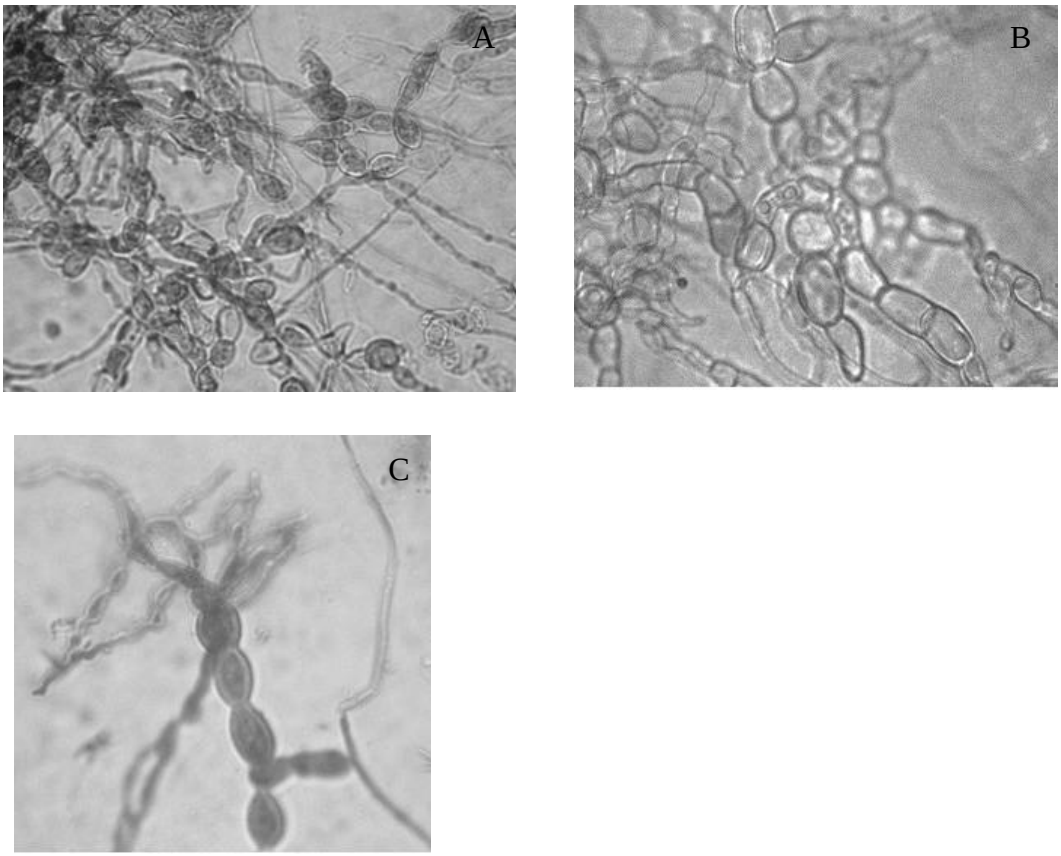


Figura 17. Morfología de las hifas provenientes de la zona de interacción con las bacterias. A), B) y C) hifas con hinchamientos, vacuoladas y sin contenido.

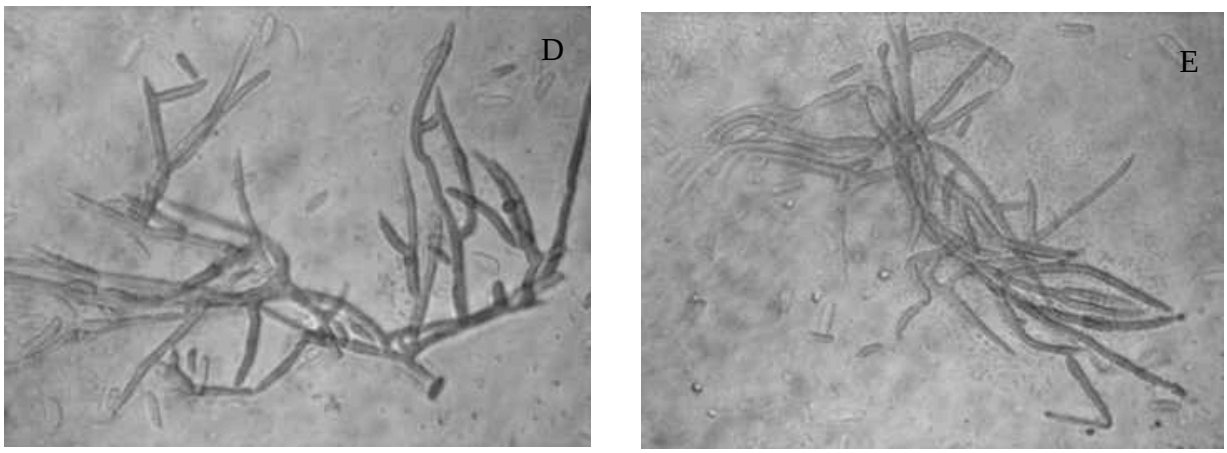


Figura 18. Hifas normales (control) D) y E) de *F. circinatum*

Inhibición del crecimiento de *F. circinatum* por metabolitos bacterianos termoestables

Todos los metabolitos bacterianos correspondientes a cada una de las bacterias produjeron inhibición en el crecimiento de las cuatro cepas de *F. circinatum* analizadas (figura 19). Sin embargo las distintas cepas bacterianas tuvieron un efecto antagónico diferente frente a *F. circinatum* (figura 21, 22 y 23).

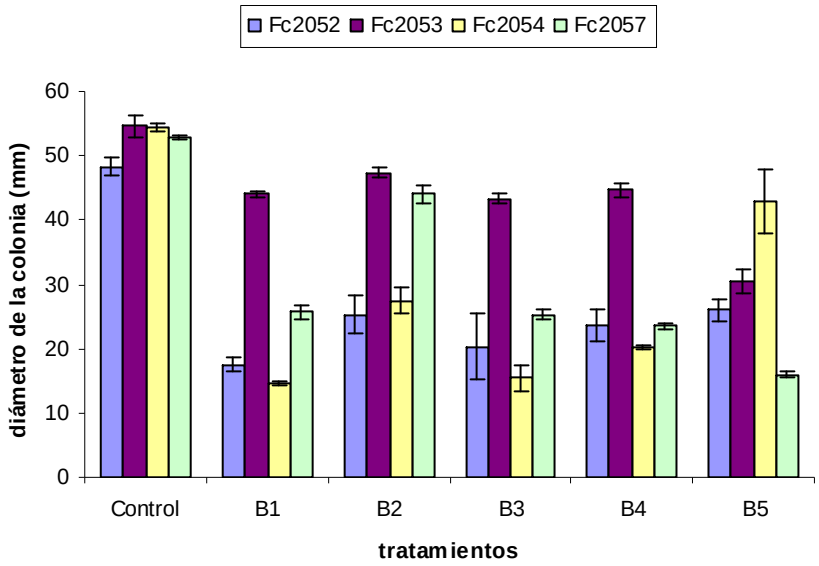


Figura 19. Crecimiento de las cepas de *F. circinatum* frente a cada uno de los tratamientos.

Para la cepa Fc2052 los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias significativas ($P<0.005$) entre el control y cada tratamiento. También se observaron diferencias significativas entre el efecto de los metabolitos de B2 con las otras tres cepas bacterianas (B1, B3 y B5) (tabla 1 anexo).

La inhibición del crecimiento de la cepa de *F. circinatum* Fc2054 por los metabolitos de B1 fue significativamente mayor que la de otras cepas siendo B5 la que tuvo un menor efecto en el crecimiento de esta cepa del patógeno.

Por otro lado, la cepa Fc2053 si bien presenta una reducción en el diámetro de la colonia respecto al control (figura 20), esta no es significativa (tabla 2 anexo). Los metabolitos de B5 redujeron el crecimiento en un 45%. Las diferencias significativas ($P<0.005$) en la velocidad de crecimiento sólo se vieron entre las bacterias B2 y B5. Los restantes tratamientos no mostraron diferencias significativas entre si (tabla 2 anexo).

Por último para la cepa Fc2057 el porcentaje de inhibición de los metabolitos de todas las bacterias (a excepción de B2) fue superior al 50% (figura 20), estas diferencias fueron significativas (P<0.005) (tabla 3 anexo)

Respecto a las diferencias entre la velocidad de crecimiento de cada cepa de *F. circinatum* en PDA, se obtuvieron diferencias significativas entre las cepas Fc2052 con Fc2053, Fc2054 y Fc2057, también entre Fc2054 con Fc2053 y Fc2057y, entre Fc2053 y Fc2057 (tabla 4 anexo).

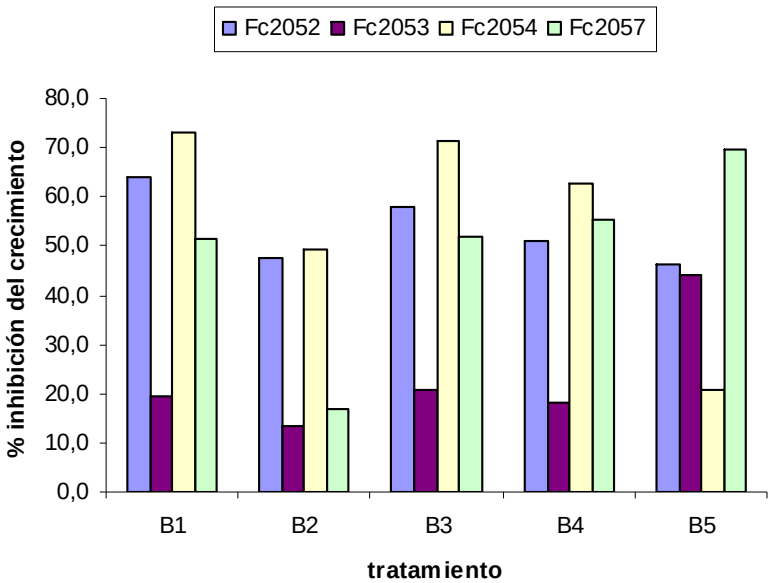


Figura 20. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de cada colonia de *F. circinatum*

En las figuras 21 y 22 se observan las diferencias en el crecimiento de la cepa Fc 2057 debido a los metabolitos termoestables de cada bacteria antagonista.

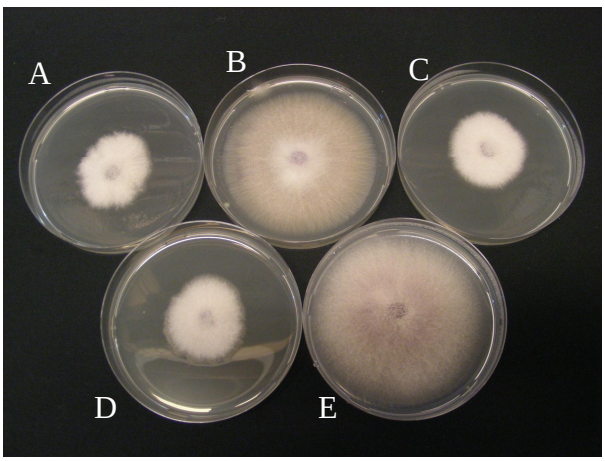


Figura 21. Inhibición en la velocidad de crecimiento de la cepa de *F. circinatum* 2057 debido a la incorporación de metabolitos bacterianos al medio de cultivo. A) B1, B) B2, C) B3, D) B4 y E) Control

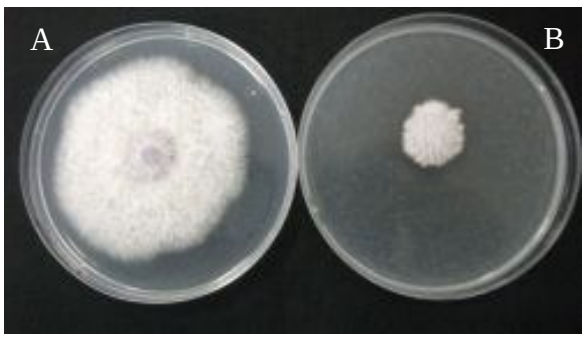


Figura 22. Inhibición en la velocidad de crecimiento de la cepa de *F. circinatum* 2057 debido a los metabolitos de B5 (B). A) Control

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo mostraron la presencia de numerosas especies de *Fusarium* asociadas a los plantines de *Pinus taeda* en vivero. Muchas especies de *Fusarium* son conocidas como patógenas de viveros forestales. Algunas enfermedades que se asocian con este grupo de hongos son damping-off, pudrición de raíces, cancros, podredumbre de semillas. Las distintas especies de *Fusarium* difieren en la especificidad por el huésped y en la patogenicidad teniendo predilección por las coníferas y, en particular por los pinos las especies de *F. acuminatum, F. avenaceum, F. equiseti, F. lateritium, F. moniliforme* y *F. circinatum* [25] [49].

La presencia de *F. oxysporum* y *F. solani* en las plantas analizadas en este trabajo, podría atribuirse a que estas especies son cosmopolitas por lo que pueden encontrarse como hongos saprófitos en cualquier tipo de suelo. *F. oxysporum* es uno da las especies con mayor distribución encontrándosela en suelos árticos, tropicales, desérticos, cultivables o no [46]. Si bien se ha visto y documentado que estas especies resultan patógenas de distintos sistemas agrícolas afectando de manera considerable a numerosos cultivos hortícolas. En especies forestales no se ha visto que tengan incidencia en el desarrollo de enfermedades. Por otro lado, es sorprendente la alta frecuencia de *F. nygamai* encontrado ya que esta especie ha sido asociada a síntomas en granos de sorgo en zonas de climas áridos y calientes [50]. Probablemente la presencia en plántulas de pinos en el país se deba a que existe una alta presión de inóculo porque esta especie ha sido encontrada en los últimos años de manera frecuente en cultivos cerealeros principalmente de sorgo y trigo, muy comunes en el territorio [Pan, D com. pers].

F. circinatum fue aislado tanto de plantines que presentaban síntoma de debilitamiento o heridas así como también de plantines asintomáticos. Esto coincide con otros estudios donde se ha visto que este hongo bajo determinadas condiciones es capaz de infectar semillas que no presentan síntoma y cuando se produce la emergencia de los plantines, también asintomáticos, es posible aislar el hongo [51]. La asociación de este hongo con semillas y plantines asintomáticos demuestra la posibilidad de su dispersión a través de material de propagación aparentemente saludable. Esto constituye un riesgo para la propagación de este importante patógeno. El mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo a partir del tejido de raíz. Esto podría atribuirse a que el tallo presenta mayor

colonización por otras especies de *Fusarium* comunes del suelo que desplazarían a *F. circinatum* o bien que esta especie tiene otro nicho que no es el suelo.

La identificación de *F. circinatum* mediante técnicas moleculares es un método rápido, sensible y confiable en comparación con la identificación en base a características morfológicas ya que ello requiere un trabajo más intenso y entrenamiento para el reconocimiento de este hongo. La utilización de los primer específicos CIRC1A y CIRC 4A permite una rápida discriminación entre las especies de *Fusarium* que se encuentran filogenéticamente emparentadas con *F. circinatum*, en particular aquellas que pertenecen al complejo *G. fujikuroi* [52]. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la identificación morfológica preliminar fue correcta ya que la posterior verificación de las cepas mediante herramientas moleculares produjo el producto de amplificación deseado.

Las especies de *Fusarium* pueden ser introducidas en los viveros mediante distintas vías ya sea a través de semillas contaminadas, dispersión de esporas por el viento, la lluvia y los insectos y por la utilización de suelo contaminado con el inóculo en cultivos anteriores [49]. El control sanitario en los viveros es fundamental para minimizar estos problemas existiendo distintas estrategias para ello. Una de las prácticas más frecuentes es la utilización de productos químicos (fungicidas). Dado que su aplicación ha generado problemas ambientales se han desarrollado otras estrategias más amigables para el ambiente como es el control biológico [49].

En este trabajo los resultados obtenidos comprobaron el efecto antagónico que presentan distintas cepas bacterianas sobre el patógeno *F. circinatum*.

Se observó un claro efecto inhibitorio de los metabolitos termoestables pertenecientes a dos géneros bacterianos (*Bacillus* y *Burkholderia*) sobre la velocidad de crecimiento del hongo. Para el caso de *B. subtilis* las cuatro cepas analizadas produjeron inhibición en la velocidad de crecimiento de todas las cepas de *F. circinatum* aunque se observaron diferencias en las respuestas según las cepas. Esto indicaría diferencias en el grado de susceptibilidad de las distintas cepas de *F. circinatum* como así también en la producción de diferentes metabolitos o compuestos antifúngicos por parte de las bacterias [40]. Se han evaluado distintas estrategias para el biocontrol del hongo causante del cancro resinoso ya sea mediante el uso de bacterias u hongos. Dumroese et al (1998) [53] vieron que *Trichoderma* spp. producía beneficios en las cubiertas de las

semillas de las coníferas lo que podría controlar las enfermedades producidas por *Fusarium* spp. en los plantines. Sin embargo Mitchel et al (2004) [54] vieron que *Trichoderma* spp. no era efectivo contra *F. circinatum*. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la evaluación de *B. subtilis* como posible agente de biocontrol de especies de *Fusarium* coinciden con otros estudios donde esta especie presenta un efecto antagonista sobre diversas especies de *Fusarium* y otros hongos de importancia fitopatógena [42]. Barrows-Broaddus & Kerr (1981) [55] encontraron que *Arthrobacter* spp. (una bacteria común del suelo) que fue obtenida durante los aislamientos de *F. circinatum*, era efectiva frente a este hongo ya que producía su inhibición en cultivo (in vitro).

Burkholderia sp también produjo un claro efecto inhibitorio en las cuatro cepas de *F. circinatum*. Esta bacteria también es muy utilizada como agente de biocontrol de muchos organismos fitopatógenos entre los que se encuentran los hongos y en particular especies de *Fusarium* así como de otros géneros que producen importantes perdidas en cultivos agrícolas [44-45].

En cuanto al efecto por bacterias vivas también se observó inhibición del crecimiento de *F. circinatum*. Las cinco cepas bacterianas tuvieron efecto antagónico sobre el patógeno. Se observaron halos de inhibición entre la colonia del patógeno y cada una de las bacterias. La formación de estos halos podría explicarse por la difusión de sustancias producidas por las bacterias causando así la inhibición del crecimiento de *F. circinatum*. Estos resultados son comparables con estudios sobre control biológico realizados por Nourozian et al. (2005) [56] quienes evaluaron la actividad antagónica de distintas bacterias (*Bacillus, Pseudomonas)* frente a *F. gramineraum* y observaron, en cultivos duales, la formación de zonas de inhibición entre la bacteria y el hongo. Según Rothrock & Gottlieb (1981) [57] la formación del halo y su tamaño podrían asociarse con la producción de antibióticos u otros metabolitos por las bacterias. La inhibición también podría explicarse, según Hsu & Lockwood (1969) [58], por la reducción de los nutrientes en las zonas que rodean a las bacterias lo que causaría menor disponibilidad de los mismos para el hongo y por lo tanto una disminución en su crecimiento. La observación microscópica confirmó cambios de modos en el crecimiento hifal, manifestados por la formación de hifas vacías, hichadas, vacuoladas y con cambios en el patrón de ramificación. Esto se produce generalmente frente a cambios en el sustrato donde crecen ya sea por falta de nutrientes, barreras mecánicas o por la presencia de

compuestos que afectan el normal desarrollo hifal. Estos resultados son congruentes con estudios hechos sobre otros hongos fitopatógenos donde se evalúa el efecto antagónico de cepas de *Bacillus* spp. [41].

Es importante destacar que las bacterias utilizadas en este trabajo como agentes de biocontrol fueron aisladas a partir del mismo sustrato del que fueron obtenidas las cepas de *F. circinatum.* Además su aplicación resulta un método seguro ya que estas no son patógenas.

La enfermedad producida por *F. circinatum* es una amenaza para las especies de pino tanto en bosques naturales como en plantaciones ya que estos son de gran importancia económica y ecológica. En 1990 fue detectado en Sud África en vivero afectando plantines de *Pinus patula.* Desde entonces se dispersó a la mayoría de los viveros forestales en Sud África siendo hoy el patógeno de *Pinus* spp. más importante en los viveros. Si bien se mantuvo restringido durante muchos años a los viveros, recientemente, en 2007, fue detectada su presencia en plantaciones de *Pinus radiata* siendo hoy uno de los mayores problemas fitosanitarios en Sud Africa [59-60]. Debido a esto es que se considera importante el desarrollo de medidas preventivas para evitar la dispersión y establecimiento de este hongo a campo en el Uruguay.

CONCLUSIONES

Se comprobó la presencia del patógeno de pinos *F. circinatum* en plantines de dos viveros forestales. Si bien no se ha cuantificado su incidencia, es importante mantener un control sanitario en los viveros de forma de evitar su dispersión a campo.

También se comprobó el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de este patógeno tanto por bacterias vivas como de sus metabolitos termoestables. Si bien la inhibición fue distinta en cada tratamiento todas las bacterias analizadas mostraron un perfil antagónico frente a *F. circinatum.*

Estos resultados validan el control biológico como método alternativo o complementario a la utilización de fungicidas químicos ya sea para minimizar el efecto de este patógeno sobre plántulas como para contribuir con el medio ambiente. Así se estarían disminuyendo los efectos contaminantes y perjudiciales que genera la aplicación de fungicidas en la salud del hombre y de los animales.

La utilización de agentes de control biológico resulta factible en viveros dado que en ellos las condiciones de desarrollo de las plantas como de temperatura y humedad son controladas.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Polla C (1998) El proceso de desarrollo forestal y agroforestal en la República Oriental del Uruguay. Trabajo presentado al Primer Congreso Latinoamericano IUFRO "El Manejo Sustentable de los Recursos Forestales - Desafío del Siglo XXI".Valdivia, Chile.

[2] Pou R & Asociados (2008) Uruguay Forestal www.uruguayforestal.com

[3] Sociedad Rural Salteña (2007): www.ruraldesalta.com.org

[4] -MGAP (2008) Anuario estadístico agropecuario. Montevideo. Uruguay

[5] Pou R & Asociados (2008) Plantaciones en Uruguay-Situación política y agroforestal www.uruguayforestal.com

[6] Pou R & Asociados: Agenda Forestal (2007) 85 pp.

[7] Alonso R, Tiscornia S, Alfenas AC & Bettucci L (2009) Fungi associated to bark lesions of *Eucalyptus globulus* stems in plantations from Uruguay *Rev. Árvore* 33, **4:**591-597.

[8] Bettucci L and Saravay M (1993) Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. *Mycological Research* **97**:679-682.

[9] Bettucci L and Alonso R (1997) A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycological Research* **10**:1060-1064.

[10] Bettucci L, Alonso R and Fernández L (1997) A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Sydowia* **149**:109-117.

[11] Bettucci L, Alonso R and Tiscornia S (1999) *a* - Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *E. globulus* and *E. grandis* in the central west region of Uruguay. *Mycological Research* **103**:486-472.

[12] Bettucci L, Alonso R and Tiscornia S (1999) *b* - Estudio fitopatológico en plantaciones de *Eucalyptus* spp. Informe técnico. Convenio EUFORES-UR.

[13] Bettucci L, Simeto S, Alonso R and Lupo S (2004) Endophytic fungi of twigs and leaves from three wild species of Myrtaceae. *Sydowia* **56**:8-23.

[14] Simeto S, Alonso S, Tiscornia S and Bettucci L (2005) Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay *Sydowia* **57**:246-258.

[15] Alonso R, Bettucci L, Tiscornia S, Martínez S, and Mionetto A (2009) Monitoreo Fitosanitario en plantaciones de *Pinus* spp: patógenos latentes y asociados a síntomas. Informe Final Proyecto PDT 77/09

[16] Porcile JF and Morey C (1992) Aspectos fitosanitarios del desarrollo forestal en Uruguay. Artículos técnicos, MGAP

[17] Ganley, R (2008) Review of the global situation of the pitch canker. Forest Biosecurity Research Council, New Zeland

[18] Chan Y-K, Mc Cormick WA and Seifert KA (2003) Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistics activities against *Fusarium* species. *Canadian Journal of Microbiology* **49**: 253-262

[19] Hepting GH and Roth ER (1946) Pitch canker, a new disease of some southern pines. *Journal of Forestry* **44**: 724-744

[20] Snyder WC, Toole ER and Hepting GH (1949) Fusaria associated with mimosa wilt, sumac wilt and pine pitch canker. *Journal of Agricultural Research* **78**: 365-382

[21] Dwinell LD and Phelps WR (1977) Pitch canker of slash pine in Florida. *Journal of Forestry* **75**: 488-489

[22] Kuhlman EG, Dwinell LD, Nelson PE and Both C (1978) Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia* **70**: 1131-1143

[23] Nelson PE, Tousson TA and Marasas WFO (1983) "*Fusarium* species: an illustrated manual for identification". (Pennsylvania State University Press: University Park, PA)

[24] O`Donnell K, Cigenlik E, Nirenberg HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 465-493

[25] Viljoen A, Wingfield M.J, Marasas WFO (1994) First report of *Fusarium subglutinans* f.sp.*pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Disease* **78**: 309-312

[26] Barnard EL and Blakeslee GM (2006) Pitch canker of southern pines. *Plant Pathology* Circular Nº32

[27] Kuhlman EG, Dianis SD, Smith TK (1982) Epidemiology of pitch canker disease in a loblolly pine seed orchad in North Carolina. *Phytopathology* **72**: 1212-1216

[28] Guerra-Santos JJ (1999) Pitch canker on Monterrey pine in Mexico. In, Devey ME, Matheson AC, Gordon TR (eds.), Forestry and Forest Products. Current and Potential Impacts of Pitch Canker in Radiata Pine. (technical report Vol.112). CSIRO Canberra, pp 58-61

[29] Wingfield MJ, Jacobs A, Coutinho TA, Ahumada R and Wingfield BD (2002) First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology* **51:** 397

[30] Perez Sierra A, Landeras E, Leon M, Berbegal M, García-Jiménez J and Armengol J (2007) Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* **111**: 832-839

[31] Kobayashi T and Muramoto M (1989) Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease of Japanese forests. *Forests Pests* **40**: 169-173

[32] Alonso R and Bettucci L (2009) First report of the Pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes* **4**: 91–92.

[33] Alabouvette C, Olivain Ch and Steinberg Ch (2006) Biological control of plant disease: the European situation. *European journal of Plant Pathology* **114**: 329-341

[34] Han-Soo K, Jiyong P, Sung-Won Ch, Kee-Hyun Ch, Gung L, Soo B, Chang L and Chung K (2003) Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control. *The Journal of Microbiology* **41**: 196-201

[35] Lagunas J, Zavaleta E, Osada S, Aranda S, Luna I and Vaquera H (2001) *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici leo* en jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* **19**: 57-65

[36] Fravel D (1998) Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **26:** 75-91

[37] Loper JE and Lindow SE (1993) Roles of competition and antibiosis in suppression of plant diseases by bacterial biological control agents. In: Lumsden D and Vaugh JL (eds.) Pest Management: Biologically Bases Technologies (pp144-155) American Chemical Society, Washington DC

[38] Weller DM and Thomashow LS (1993) Microbial metabolites with biological activity. In: Lumsden D and Vaugh JL (eds.) Pest Management: Biologocally Based Technologies (pp. 173-180) American Chemical Society, Washington, DC

[39] Todorova S and Kozhuharova Lubka (2009) Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 1207-10216

[40] Moita C, Feio SS, Nunes L, curto MJM and Roseiro JC (2005) Optimization of physical factors on the production of active metabolites by *Bacillus subtilis* 355 against wood surface contaminant fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* **55**: 261-269

[41] Chen F, Wang M, Zheng Y, Luo J, Yang X and Wang X (2009) Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 675-684

[42] Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF and Stuart JD (2009) Rapid quantifiction of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 374-379

[43] Sophеareth m, Seug-Je L, hoon H, Yong-Wong K, Keun-Hyung P, Gyu-Suk C, Ro-Dong P and Kil-Yong K (2006) Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. *Current Microbiolgy* **53**: 358-364

[44] Quan CS, Zheng W, Liu Q, Otha Y and Fan SD (2006) Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbial and Cell Physiology* **72**: 1276-1284

[45] Sijam K and Dikin A (2005) Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *International Journal of Agriculture and Biology* **7:**385-388

[46] Leslie JF Summerel B and Bullock S (2006) The *Fusarium* laboratory manual 388 p. Blackwell Publishing Professional, Iowa

[47] Schweigkofler W, O`Donnell K and Garbelotto M (2004) Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch

canker, from California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trappind method. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3512-3520

[48] Kupper K, Gimenes-Fernandes N and de Goes A (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos citricos. *Fitopatologia Brasilera* **28**: 251-257

[49] Viljoen A, Wingfield MJ and Crou PW (1992) Fungal pathogens in *Pinus* and *Eucalyptus* seddling nurseries in South Africa: A review. *South Africa Forestry Journal* **161**: 45-50

[50] Burguess LW and Trimboli D (1986) Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia* **78**: 223-229

[51] Storer AJ, Gordon TR and Clark SL (1998a) Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. p*ini* with Monterey pine seeds, and seedlings in California. *Plant Pathology* **47**: 649-656

[52] Ioos R, Fourier C, Iancu G and Gordon TR (2009). Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in Pine seed by combinig an enrichment procedure with a real time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopatholgy* **99**: 582-590

[53] Dumroese RK, James RL, Wenny DL and Gilligan CJ (1998) Douglas-fir seed treatments: effects on seed germination and seednorne organisms. En “Proceedings of the combined meeting of the western forest nursery associations, 8-11, August 1998”. (Ed. RC Shearer) pp 155-160.

[54] Mitchel RG, Zwolinski JJ, Jones J and Coutinho TA (2004) The effects of applying profilactic measures on the post – planting survival of *Pinus patula* in South Africa. *Southern Africa Forestry Journal* **200**: 51-58

[55] Barrows-BroaddsJ, and Kerr TJ (1981) Inhibition of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, the causal agent of pine pitch canker fungus, by the soil bacterium *Arthrobacter* sp. *Canadian Journal of Microbiology* **27**: 20-276

[56] Nouzarian J, Etebarian HR and Khodakaramian G (2005) Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklananakarin J Sci Technol* **28**: 29-38

[57] Rothrock C and Gottlieb D (1981) Importance of antibiotic production in anatagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogen. *The Journal of Antibiotics*. **34:** 830-835

[58] Hsu SC and Lockwood JL (1969) Mechanism of inhibition of fungi in agar by *Streptomyces violaceoniger*. *Canadian Journal of Botany* **72**: 480-485

[59] Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD and Coutinho TA (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Disease* **37**: 319-334

[60] Porte B, Wingfield MJ and Coutinho TA (2009) Susceptibility of south african native conifers to the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum*. *South African Journal of Botany* **75**: 380-382

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

PDA (Papa Dextrosa Agar)

Papas blancas 250g
Glucosa 20g
Agar 20g

Lavar las papas, cortarlas en pequeños cubos y ponerlas a hervir en aproximadamente 500ml de agua de agua durante 45 minutos. Luego filtrar y agregar al agar, previamente fundido en 500 ml de agua. Agregar 20g de glucosa y llevar a un litro. Esterilizar a 121 ºC durante 15 minutos.

CLA (Agar hojas de clavel)
Esterilizar pedacitos de hoja de clavel y repartirlos (3 a 5) por cada caja de Petri con agar-agua al 2 %.

SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

KH_2PO_4 1g
KNO_3 1g
$MgSO_4.7H_2O$ 0.5g
KCl 0.5g
Glucosa 0.2g
Sacarosa 0.2g
Agar 20g

Mezclar los distintos reactivos en 1litro de agua destilada, fundir por 10 minutos y luego autoclavar a 121 ºC durante 15 minutos.

Agar –Agua 2%

Agar 20g
Agua 1litro

Mezclar el agar con agua destilada y fundirlo aproximadamente durante 5 minutos. Luego esterilizar a 121 ºC durante 15 minutos

TSA (Tripton Soya Agar)

TSA 40gramos
Agua destilada 1litro

Disolver el TSA en 1litro de agua y calentar en microondas durante 5 minutos. Luego esterilizar a 121 ºC durante 15 minutos.

SECUENCIAS

Secuencia del amplicón de 360pb de *Fusarium circinatum* obtenida con el primer específico CIRC1A.

CIRC1A

GNNGNNNNGNAGTCTAGGGTAGGCTGAATGTATGATTATGTAAGCTGTATA
GCTCTAGGGTAGGTAAAAATCCCATACAAATCTGATTGGAATTGGTGAAGA
TGTGATTTGGCTGGAGAGATGGACGAAAGTGCAATGCAGAACTGTATGTGA
TTTTGCAAAAGTGAGTGTAAAGATGGAAAGTCGATGTTCCCGAGCAGGTGA
GAGCACGTTTGAGACGTCATCGGATGCGCCTCGTCGAGACGAGCACAACGG
TGTAGCCCATGTGTGTGCACGACTCCTGTGCGTCCGTCCAGGGCGGGATAA
GTAGAAAAGTGAGAGGTGAGGGTAGGAAATGAGAGGTGTAGGGTAGGAAT
TACGGAGTGTTGGTCATTTCAACCCTCAAGCTCCCGGGCTTGTTGTTGGGGC
CCAGCCTTGTCAAAGAGGCCGGCCCTCCTTTTATGGGGGGAGGGCTGAAAC
TCCGAGCATATTAATTACTTCCCGCTTAGGTTGACTTAGCGACCCTCTGCCTT
AAAACCCCCTACATTTTTCTGACAGTTGACCTCGTTTCAGGTATGTATCCCC
CGCAGAGCTTAAACTTANGGAGACCAAAAAAAAAAACGNCTTCTCAACCGT
GNACTCTTTTTCTTTACCACTCCTGTACGGGCTCGCGATTTAGGACTCGTCA
ATGACCCGAGCGTGGCCTCAAGTATCAGAGGTGTTTANAAGNANCGGATGC
TTC

Secuencia de *Burkholderia* sp correspondiente al ADNr 16S obtenida con los primers 27F, 518F y 1492R

TCGAACGGCACCACGGGTGCTTGCCCAGGTGGAAGTGGCGAACGGGTGAGT
CTACTTCTGAACATGTCCTGTGGTGGGGGATGCCCGGCCAAATGTGGATTAA
TACCGCAAACAATCTACGGATGAAGACGGGGGACCTTCGGACCTCGCGCTA
TGGGGGTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCAA
GGCGACGATCCTGGCTGGTCTGAGAGGACCACACTCCACACTGAGGCTGAG
ACACGGACCATACTCCTACGGGAGGCAGCCTGGGGGAATTTTGGACAATGG
GCGAAAGCCTGATCCAGGTTTGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAATTCCTTGGTTCTAATATACCCGGGGGAT
GACGGTACCGGAAGAATAATCACATTCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACTTTGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGTCTTAAAACTGCGCGT
GATACTGTTGTTCTGACCGGTGTGAAATCCCCGGG-
CTCAACCCGGGAACTGCCTTGGAGACTGG-AAG-
TCTTGAGTATGGCAGAGGGGGGTGGAATTCCAAGTGTAGAAGTGAAATGCG
TAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGGCCCCCTGGGCCATTACT
GACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCCTAAACGATGTCAAGTAATTGTTGGGGATGCTTTTCCTTAGTA
GCGTAACTTACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG-
TGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGA
CATGGTCGGAATCCCGCTGAAAAGTGGGATTGCTCTAAAGATAACCCGCAC
ACAGGTGC-
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTTC-
ACGCAAGAGCACTTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG

GGATGACGTCCAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAC
AATGGTCGGAACAGAGGGTTACCAACCCGCGAGGGGGAAGTAATTCCAGA
AAACCCATCTTAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGCGACT
AGTGCTAACC

ANÁLISIS DE DATOS

Tabla 1. Resultado de Tukey Test para la cepa Fc2052. (Col 1=Control Fc2052, Col 2=Fc2052+B1, Col 3=Fc2052+B2, Col 4=Fc2052+B3, Col 5=Fc2052+B4 y Col 6=Fc2052+B5)

Comparación	**Diferencias en la media**	**p**	**q**	**P**	**P<0,050**
Col 1 vs. Col 6	20,167	6	13,662	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 2	19,417	6	13,154	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 4	17,667	6	11,968	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 5	16,375	6	9,922	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 3	8,750	6	5,928	0,014	Si
Col 3 vs. Col 6	11,417	6	7,734	0,002	Si
Col 3 vs. Col 2	10,667	6	7,226	0,004	Si
Col 3 vs. Col 4	8,917	6	6,041	0,013	Si
Col 3 vs. Col 5	7,625	6	4,620	0,063	No
Col 5 vs. Col 6	3,792	6	2,297	0,601	No
Col 5 vs. Col 2	3,042	6	1,843	0,778	No
Col 5 vs. Col 4	1,292	6	0,783	0,992	No
Col 4 vs. Col 6	2,500	6	1,694	0,829	No
Col 4 vs. Col 2	1,750	6	1,186	0,954	No
Col 2 vs. Col 6	0,750	6	0,508	0,999	No

Tabla 2. Resultado de Tukey Test para la cepa Fc2053. (Col 1= Control Fc2053)

Comparación	**Diferencia en las medias**	**p**	**q**	**P**	**P<0,050**
Col 3 vs. Col 6	2,500	6	5,617	0,018	Si
Col 3 vs. Col 2	1,817	6	4,082	0,109	No
Col 3 vs. Col 1	1,167	6	2,621	0,471	No
Col 3 vs. Col 5	0,950	6	2,134	0,666	No
Col 3 vs. Col 4	0,533	6	1,198	0,952	No
Col 4 vs. Col 6	1,967	6	4,419	0,074	No
Col 4 vs. Col 2	1,283	6	2,883	0,377	No
Col 4 vs. Col 1	0,633	6	1,423	0,907	No
Col 4 vs. Col 5	0,417	6	0,936	0,983	No
Col 5 vs. Col 6	1,550	6	3,482	0,210	No
Col 5 vs. Col 2	0,867	6	1,947	0,739	No
Col 5 vs. Col 1	0,217	6	0,487	0,999	No
Col 1 vs. Col 6	1,333	6	2,996	0,340	No
Col 1 vs. Col 2	0,650	6	1,460	0,898	No
Col 2 vs. Col 6	0,683	6	1,535	0,878	No

Tabla 3. Resultado de Tukey Test para la cepa Fc2057. (Col 1= Control Fc2057)

Comparación	**Diferencia en las medias**	**p**	**q**	**P**	**P<0,050**
Col 3 vs. Col 6	8,226	6	15,393	<0,001	Si
Col 3 vs. Col 5	4,900	6	9,169	<0,001	Si
Col 3 vs. Col 2	3,700	6	6,924	0,004	Si
Col 3 vs. Col 4	3,083	6	5,770	0,015	Si
Col 3 vs. Col 1	1,036	6	1,938	0,743	No
Col 1 vs. Col 6	7,191	6	13,455	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 5	3,864	6	7,231	0,003	Si
Col 1 vs. Col 2	2,664	6	4,986	0,038	Si
Col 1 vs. Col 4	2,048	6	3,832	0,144	No
Col 4 vs. Col 6	5,143	6	9,624	<0,001	Si
Col 4 vs. Col 5	1,817	6	3,399	0,229	No
Col 4 vs. Col 2	0,617	6	1,154	0,959	No
Col 2 vs. Col 6	4,526	6	8,470	<0,001	Si
Col 2 vs. Col 5	1,200	6	2,246	0,621	No
Col 5 vs. Col 6	3,326	6	6,224	0,009	Si

Tabla 4. Resultado de Tukey Test entre los distintas cepas de *F. circinatum.* (Col 1= Fc2052, Col 2= Fc2053, Col 3 = Fc2054 y Col 4 = Fc2057)

Comparación	**Diferencia en las medias**	**p**	**q**	**P**	**P<0,050**
Col 1 vs. Col 4	17,286	4	28,147	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 2	16,850	4	27,437	<0,001	Si
Col 1 vs. Col 3	4,500	4	7,327	0,004	Si
Col 3 vs. Col 4	12,786	4	20,819	<0,001	Si
Col 3 vs. Col 2	12,350	4	20,110	<0,001	Si
Col 2 vs. Col 4	0,436	4	0,709	0,956	Si