

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Sub área Microbiología

Poblaciones fúngicas que afectan la producción de
pino en Uruguay

Mag. Raquel Alonso Ariztia

Sección Micología, Facultad de Ciencias

Orientadora: Dra. Lina Bettucci

Co-orientador: Dr. Andrés Dieste

Tribunal
Dra Magela Laviña
Dr. Carlos Pérez
Dra. Carmen Viera

Uruguay, Agosto de 2021

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento es para mí orientadora Dra. Lina Bettucci. Ella ha sido mi gran maestra, que a lo largo de mi vida académica me ha enseñado a entender el fascinante mundo de los hongos e interpretar las relaciones que estos organismos establecen con otras comunidades. Sin su apoyo permanente, afecto y perseverancia no hubiese sido posible la culminación de este trabajo. ¡Gracias Lina!

A mi co-orientador Dr. Andrés Dieste, por proponernos trabajar de forma coordinada en el tema de preservación de las maderas y poder aplicar, en ello, nuestros conocimientos micológicos. Gracias por aceptar ser mi co-orientador y por la revisión del manuscrito.

A la Dra. Magela Laviña, Dr. Carlos Pérez y Dra. Carmen Viera mi más sincero agradecimiento. Aceptaron ser parte del tribunal de esta tesis, hicieron una lectura y análisis crítico del manuscrito que me permitieron mejorar el mismo y me estimularon a culminar con esta etapa.

A mis compañeros que han pasado a lo largo de estos años por el Laboratorio de Micología, gracias por soportarme todos estos años y estimularme a culminar esta etapa, en especial a los que participaron en alguna parte de este trabajo, Susana, Silvina, Sebastián, Belén.

A Demian Gómez, fue un placer trabajar con el y recorrer campos buscando escolítidos, me enseñó mucho sobre estos insectos. También a Andrés de Errasti, que vino desde la Patagonia con su experiencia a colaborar en la búsqueda e identificación de los hongos manchadores.

A INIA y CONICYT por financiar parte de este trabajo. A las empresas forestales Cambium, Arazatí, Weyerhaeuser y a la Ing. Ma. Pia Rosales por compartir sus conocimientos en las plantaciones y por las numerosas muestras suministradas.

A mis amigas incondicionales, Laura, Sylvia, Maricarmen, Negra, Ceci, Noel, Gorda, que estando cerca o a miles de kilómetros me han dado todo su cariño y apoyo en este camino.

A mis amores y mi mayor orgullo, Lucía, Andrés y Sergio.

INDICE

Resumen	1
Introducción general	5
Bibliografía	9
Capítulo 1 Hongos endófitos y asociados a síntomas de acículas y ramas pequeñas de <i>Pinus taeda</i> y <i>Pinus elliotti</i>	
Introducción	12
Objetivos	16
Materiales y métodos	16
Resultados	20
Discusión	32
Bibliografía	36
Capítulo 2 <i>Fusarium circinatum</i>, un patógeno cuarentenario	
Introducción	43
Objetivos	46
Materiales y métodos	46
Resultados	49
Discusión	54
Bibliografía	58
Capítulo 3 Hongos manchadores de madera asociados a escarabajos de la corteza	
Introducción	62
Objetivos	69
Materiales y métodos	69
Resultados	73
Discusión	80
Bibliografía	85
Capítulo 4 Actividad degradadora de Basidiomycetes sobre madera aserrada de <i>Pinus taeda</i> y efecto de la modificación térmica en su durabilidad	
Introducción	93
Objetivos	98
Materiales y métodos	99
Resultados	102
Discusión	107
Bibliografía	112
Conclusiones generales	117
	119

RESUMEN

Uruguay, teniendo en cuenta la creciente demanda de productos forestales en el mercado mundial, ha incluido la forestación como uno de sus rubros prioritarios, desde principios de los 90. Actualmente, las hectáreas plantadas, mayoritariamente de especies de *Eucalyptus* alcanzan el millón. Las plantaciones de *Pinus* spp. ocupan aproximadamente el 30% de la superficie con un destino fundamentalmente maderable. Debido a esa gran biomasa forestal los problemas fitosanitarios constituyen un alto riesgo. La investigación en el área fitosanitaria se ha centrado fundamentalmente en especies de *Eucalyptus*, pero existen pocos antecedentes para las especies de *Pinus*.

El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar los problemas sanitarios asociados a hongos en la producción de *Pinus* spp. Se efectuaron estudios con diferentes abordajes: estudio de los hongos endófitos y asociados a síntomas de acículas y ramas pequeñas; detección de patógenos o enfermedades no registradas aún para Uruguay; estudio de los hongos manchadores de la madera asociados a escarabajos de la corteza y finalmente estudios de la capacidad de colonizar madera aserrada por especies de hongos de la podredumbre blanca y castaña.

Estudio de los hongos asociados a acículas y ramas

Se realizaron muestreos de ramas y acículas sanas y sintomáticas en plantaciones de *Pinus taeda* y *Pinus elliotii*. Se estudió la composición de hongos endófitos aislados de tejidos desinfectados superficialmente. De los hongos asociados a las acículas, se encontró que las especies de *Lophodermium* son las más frecuentes. Algunas son endofíticas asintomáticas y sólo se desarrollan en acículas senescentes o muertas y participan en el proceso de descomposición. Otras especies encontradas con alta frecuencia correspondieron al género *Xylaria*. De estos resultados cabe destacar que las Xylariaceae, en general, colonizan preferentemente tejidos de Angiospermas, aunque se las han encontrado como endófitos de acículas de coníferas europeas. En Uruguay, se ha encontrado a *X. enteroleuca* como endófito dominante en especies nativas de Myrtaceae y probablemente éstas constituyan una fuente de inóculo. Las especies de *Xylaria* tienen un rol importante en la degradación de recursos lignocelulósicos ya que se caracterizan por tener una actividad celulolítica importante.

En las ramitas, los endófitos dominantes del xilema de *P. taeda*, correspondieron a especies de *Phaeomoniella*, género que contiene especies patógenas de troncos de vid.

En el caso de *P. elliotti* la especie dominante fue *Lophodermium australe*. En la corteza de ambas especies de pino, se encontraron especies fundamentalmente asociadas al saprofitismo y solo la presencia de *Botryosphaeriaceae* podría llevar algún riesgo sanitario ya que es una familia que contiene especies fúngicas asociadas a enfermedades de numerosas especies arbóreas.

Fusarium circinatum, un patógeno cuarentenario

Se analizaron plántulas de viveros con síntomas de marchitamiento de acículas y lesiones en la base de los tallos. Se aisló e identificó la especie *Fusarium circinatum* como agente causal de dichos síntomas. A partir de este trabajo se realizó el primer registro de este patógeno cuarentenario en el país y en una especie de pino que no es de las más susceptibles. Por otra parte, se realizaron inoculaciones experimentales en plantines con diferentes aislados del hongo para evaluar la variabilidad en la virulencia, detectando diferencias entre las cepas.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó un seguimiento y monitoreo durante varios años en plantaciones de campo de diferentes regiones del país a fin de evaluar su presencia y expansión. No se detectaron infecciones de *F. circinatum* en árboles a nivel de campo. Probablemente debido al control y manejo efectuado en vivero luego de la detección de este patógeno, no hubo propagación de este a las plantaciones.

Hongos manchadores de madera asociados a escarabajos de la corteza

En los últimos años, en Uruguay uno de los principales problemas sanitarios de las plantaciones de pino fue la detección y rápida expansión de los escarabajos de la corteza (Scolytinae). Estos insectos colonizan los troncos de árboles debilitados, forman galerías donde depositan sus huevos y larvas que se alimentan del cambium y floema, llegando a producir la muerte de los árboles. Los escarabajos de la corteza son además importantes vectores de hongos que colonizan la madera, siendo transportados en la superficie de su cuerpo o en micangios. Las esporas de estos hongos colonizan y desarrollan un micelio que al avanzar por los radios parenquimáticos producen decoloración de la albura “sap stain” o “blue stain”. Este daño post-cosecha reduce significativamente el valor comercial de la madera llegando a ser rechazada para su procesamiento si el alcance del machado es significativo. Los hongos responsables de este proceso pertenecen a los Ophiostomatales. Dada la expansión e impacto que los insectos vectores de estos hongos

han tenido, se propuso estudiar la presencia de especies de Ophiostomatales asociados a los escarabajos de la corteza de pino.

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de hongos manchadores asociados a tres especies de escolítidos (*Hylurgus ligniperda*, *Cyrtogenius luteus* y *Orthotomicus erosus*). Se aislaron e identificaron morfológica y filogenéticamente las especies presentes. *Ophiostoma ips*, fue la especie más frecuente y está asociada a las tres especies de escolítidos, otras especies presentes fueron *Ophiostoma abietinum*, *Ophiostoma quercus* y *Grosmannia radiaticola*. Las especies fúngicas encontradas constituyen típicos agentes causales de mancha azul.

Colonización y degradación de madera aserrada de Pinus taeda por especies de hongos de la podredumbre blanca y castaña

En Uruguay, *Pinus taeda* es la principal especie de pino plantada con fines maderables, tiene una geometría que permite la transformación mediante aserrado o debobinado en piezas prismáticas para la fabricación de productos para la construcción y carpintería. Sin embargo, esta madera, presenta debilidades en cuanto a la estabilidad dimensional y la baja durabilidad natural, con una escasa resistencia al ataque de hongos e insectos. El secado de la madera cercano al 10% permite mitigar ambos impactos. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la actividad de hongos de la podredumbre en madera estacionada de *P. taeda*. Se evaluó la capacidad de penetración del micelio de hongos a través de la cara tangencial de tablas aserradas. Se utilizaron probetas obtenidas de tablas aserradas a las que se les sellaron las caras radial y transversal con resina epoxi y se les inoculó discos conteniendo micelio de dos especies de hongos frecuentemente presentes en la región, *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* correspondientes a la podredumbre blanca y castaña respectivamente. Por otra parte, se evaluó con estas mismas especies, la durabilidad de madera modificada térmicamente como forma de protección contra la biodegradación.

Se determinó que las maderas fueron colonizadas por *G. trabeum* con una pérdida de peso de 32% luego de 27 semanas de incubación. En cambio *T. versicolor* solo produjo una pérdida de peso del 10% en el mismo período. Estos resultados concuerdan con que los hongos de la podredumbre castaña afectan fundamentalmente especies de coníferas. Estos resultados demuestran que las tablas aserradas secas son susceptibles a la degradación por especies que se encuentran frecuentemente en el país.

El tratamiento térmico de las maderas, evaluado en este trabajo, mostró ser efectivo para aumentar la durabilidad de las maderas frente a *G. trabeum*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los problemas fitosanitarios que se estudian en esta tesis son producidos por hongos como componente biológico principal del complejo causal. La amplia diversidad morfológica de estos organismos está asociada a la diversidad trófica y a las adaptaciones estructurales que presentan, bases fundamentales de su capacidad degradadora en un ecosistema.

Los hongos forman parte del subsistema descomponedor dentro de un ecosistema, sea natural o se trate de una plantación. Estos hongos, son saprótrofos y su principal función es degradar la biomasa vegetal muerta y liberar sus componentes mediante la producción de complejos sistemas enzimáticos para hacerlos asimilables nuevamente por las plantas, o inmovilizándolos. Otras especies, las biótrofas establecen variadas relaciones con los materiales vegetales vivos. Algunas especies biótrofas son altamente beneficiosas, como las micorrizas, otras son patógenas severas. Las especies necrotróficas, son también patógenas y establecen una relación con los tejidos vegetales en el que participan tanto enzimas como toxinas en el proceso de patogenicidad. Entre ambos tipos de relaciones tróficas se encuentran los hongos hemibiótrofos que presentan una secuencia de infección que va desde la biotrófica a la necrotrofica para la colonización del hospedante. Estas formas de patogenicidad que afectan a las plantas constituyen otra modalidad que disponen los hongos de participar en la regulación de la biomasa vegetal.

En particular se atenderá, en el marco de esta tesis, los diversos problemas fitosanitarios de las plantaciones de pinos en Uruguay y de su producto final, la madera, que tienen como principal componente la actividad de diversos grupos de hongos.

Vista la creciente demanda de productos forestales en el mercado mundial, Uruguay ha incluido a la forestación como rubro prioritario. A partir de la promulgación de la ley forestal en 1989, la superficie forestada con especies exóticas tuvo un incremento exponencial durante los primeros 10 años que siguió en aumento hasta alcanzar en la actualidad un millón de hectáreas (MGAP 2018). En 2019 el sector forestal industrial fue el primer complejo exportador del país, con un total de 1.886 millones USD, correspondiente a pasta de celulosa y madera, 1.527 y 359 millones USD respectivamente (Uruguay XXI 2020).

Uruguay se encuentra situado en la zona templada de Sud América (30° y 35° de latitud Sur y los meridianos 53° y 58° de longitud) en latitudes comparables a la de los principales países productores forestales del hemisferio sur como Australia, Nueva

Zelanda, Sudáfrica y Chile. Las condiciones locales de temperatura, humedad y características edáficas han demostrado ser aptas para el buen desarrollo de especies de interés en la explotación forestal. Del total del área forestada, el 70% corresponde a *Eucalyptus* spp., siendo *E. grandis*, *E. dunnii*, y *E. globulus* las especies más plantadas. Las especies de coníferas alcanzan aproximadamente el 30%, siendo *Pinus taeda* y *P. elliotti* las especies más importantes (MGAP 2018). El fin de los productos madereros es, en primer lugar, el abastecimiento de la cadena celulósico-papelera a través de la producción de pulpa de celulosa y papel, luego la producción de madera elaborada o rolos, y por último la producción de energía (leña o electricidad producida de biomasa).

El pino se introdujo en Uruguay a principios del siglo XIX, pero a mediados de este siglo *Pinus radiata* comenzó a ser plantado a mayor escala en la franja costera con el fin de fijar las dunas (Porcile 2007). Mas tarde se importaron semillas de *Pinus taeda* L. y *Pinus elliottii* Engelm. desde Estados Unidos que se distribuyeron en plantaciones en distintas partes del país mostrando un buen comportamiento en adaptación y crecimiento. Mas tarde, con el impulso del sector forestal se fue incrementando la superficie plantada y nuevas plantaciones de *P. taeda* y *P. elliotti* se instalaron fundamentalmente al norte del Rio Negro en los Departamentos de Rivera y Tacuarembó alcanzando las 260 mil hectáreas. Actualmente existen 164 mil hectáreas de pino (MGAP 2020), ubicadas mayoritariamente en esos mismos departamentos. El comportamiento de estas especies es muy bueno en estos sitios, con turnos de 20 a 25 años, y manejados para la producción de trozas aserrables (van Hoff 2001). Para esa biomasa forestal los problemas fitosanitarios constituyen un riesgo potencial y real que no han sido abordados en profundidad. Se han realizado numerosos estudios fitosanitarios en *Eucalyptus*, a medida que iban surgiendo problemas asociados a ellos. Los primeros trabajos comenzaron con el estudio de las comunidades de hongos endófitos y asociados a lesiones de *Eucalyptus globulus* y *E. grandis* habiéndose efectuado un monitoreo intensivo en el litoral oeste, centro y este del país (Bettucci & Saravay 1993, Bettucci & Alonso 1997, Bettucci *et al.* 1997, Alonso *et al.* 1999, Alonso *et al.* 2005, Simeto *et al.* 2005). Gracias a los aportes de estos trabajos se pudo establecer el efecto de los factores ambientales en la generación de algunos de los síntomas presentes y también evaluar la real función de los hongos asociados a los mismos. Se continuó con el estudio de los organismos causales de enfermedades, que en muchos casos correspondieron a nuevas introducciones de patógenos (Palladino *et al.* 2016, Pérez *et al.* 2009, Pérez *et al.* 2009b, Soria *et al.* 2014) y en otros, a saltos de patógenos de plantas nativas hacia las plantaciones (Pérez *et al.*

2008 ab, Pérez *et al.* 2009c, Pérez *et al.* 2010, 2011, 2013). Pese a que existe poca información actualizada sobre la incidencia de problemas fitosanitarios en las plantaciones de pinos, existen registros de enfermedades como la banda roja producida por *Dothistroma pini* (*Mycosphaerella pini*, Rostr.) (Bettucci & Guerrero 1970, FAO 2006), muerte y manchas de acículas por *Hypoderma desmazieri* Duby (*Meloderma desmazieri*, (Duby Darker) (Bettucci & Guerrero 1970, FAO, 2005), marchitamiento y muerte apical de vástago en vivero, producción de canchales y coloración en la albura producidos por *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) (*Diplodia pinea*) (Koch de Brotos *et al.* 1981), uno de los patógenos más comunes y ampliamente distribuidos entre las coníferas. Pero fue en los años recientes que se sospechó de la presencia de un patógeno cuarentenario, *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, que provoca el cancro resinoso del pino. La acción de este patógeno provoca importantes pérdidas económicas en bosques naturales y en las plantaciones de numerosas especies de pinos y otras coníferas (Wingfield *et al.* 2008).

Los principales problemas que han surgido en las plantaciones extensivas de pino en Uruguay y han demandado más estudio, son aquellos asociados a la acción de insectos. Por ejemplo, la avispa *Sirex noctilio*, registrada por primera vez en 1980 en Uruguay, alcanzó niveles epidémicos en 1985 siendo declarada plaga nacional (Decreto 820/985, Montevideo 23/12/85) (Bianchi 1992). Esta avispa está íntimamente relacionada a *Amylosterum areolatum* un hongo causal de podredumbre blanca con el que ha coevolucionado de manera eficiente. La avispa ovipone en el tronco y al mismo tiempo que inocula el hongo. La acción barrenadora de las larvas y la descomposición de la madera por el hongo, hacen que esta asociación sea nociva para la producción de pinos. La introducción de un nemátodo controlador de la avispa junto con el raleo de árboles afectados ha logrado controlar este problema en el país (Bianchi 1992). Otro insecto, *Pissodes castaneus*, el gorgojo del pino ocasionalmente causa daños en plantaciones jóvenes en condiciones de estrés, pero no reviste mayor importancia sanitaria (Van Hoff 2001).

A partir de 2008-2009 uno de los principales problemas sanitarios que se ha detectado en las plantaciones de pino es la presencia y rápida expansión de escarabajos de la corteza (Scolytinae) (Gómez & Martínez 2012, Gómez 2014). Estos insectos, son considerados plagas severas en la explotación forestal de coníferas. Tienen gran impacto en la calidad de la madera, llegando a provocar importantes tasas de mortalidad de árboles. Además del daño directo que ocasionan, otra característica de los escarabajos de la corteza es su

estrecha asociación con hongos Ophiostomatales (Ascomycota) causantes de decoloración de la madera (mancha azul) que reduce significativamente su valor. Forman parte de esa asociación especies patógenas importantes, como *Ophiostoma ulmi* y *Ophiostoma novo-ulmi*, que causan la enfermedad del olmo, provocando la muerte de millones de olmos en Europa y Norte América (Brasier 1991). En Uruguay no existen antecedentes sobre este grupo de hongos.

Además del impacto que pueden tener los hongos en la sanidad de las plantaciones, existen especies que afectan el producto final, es decir, la madera. Como se mencionó previamente, el manchado provocado por los hongos Ophiostomatales afecta su valor comercial. Por otra parte, los Basidiomycetes descomponedores de la madera, que juegan un importante papel en la degradación de los restos lignocelulósicos en los bosques, también pueden afectar la madera aserrada proveniente de los pinos (Bagley & Richter 2002). No existen en el país antecedentes relacionados con estudios del comportamiento de estos hongos frente a madera aserrada de pino.

En síntesis, dado que las especies del género *Pinus* constituyen un recurso de gran importancia en la industria maderera del país, se plantea iniciar un estudio fitosanitario en las áreas donde han sido intensamente plantadas, en particular, en el centro y centro-norte del país. Además, es importante conocer las especies de hongos asociadas a los insectos, ya que, en los últimos años afectan de manera importante las plantaciones. En cuanto al producto final, la madera aserrada, es perentorio evaluar cómo afectan su calidad los hongos degradadores, para desarrollar estrategias de conservación de la madera y poder garantizar el éxito en la producción nacional de maderas de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso R, Lupo S & Bettucci L (2005). Pathogenicity evaluation of *Cytospora eucalypticola* isolated from *Eucalyptus* cankers in Uruguay. *Fitopatologia Brasileira* 30: 289-291.

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.

Bagley S & Richter DL (2002). Biodegradation by brown rot fungi. En: Osiewicz HS (ed.). *The Mycota*. Springer. Heidelberg. pp. 327-340.

Bettucci L & Guerrero R (1970). Needle cast producido por *Hypoderma desmazieri* Darker. *Boletín del Departamento Forestal* 16: 1-2.

Bettucci L & Alonso R (1997). A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. *Mycological Research* 101: 1060-1064.

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

Bettucci L, Alonso R & Fernández LM (1997). A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Sydowia* 49: 109-117.

Bianchi M (1992). Situación de *Syrex noctilio* y otros insectos plaga en Uruguay. *Facultad de Agronomía* 65-71 pp.

Brasier CM (1991). *Ophiostoma novo-ulmi* sp.nov., causative agent of the current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115:151-161.

FAO (2006). *Manual Plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay*. Manual de Campo, 173pp.

Gómez D, Martínez G & Beaver RA (2012). First Record of *Cyrtogenius luteus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in the Americas and its Distribution in Uruguay. *The Coleopterists Bulletin*, 66:362-364.

Gómez D (2014). *Diversidad y Estacionalidad de Escarabajos de Corteza (Coleoptera: Scolytinae) en Pinus taeda L. en Uruguay*. Tesis de Maestría PEDECIBA, UdelaR:100p.

Koch de Brotos L, Boassi C, Riccio de Machado O, Gandolfo Antúnz C (1981). Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. Ministerio de Agricultura y Pesca. Informe Técnico 9, 140 pp.

MGAP (2018). Anuario estadístico de DIEA. Montevideo, Uruguay.

MGAP (2020) Inventario anual de coníferas (<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/resultados-del-inventario-nacional-forestal-coniferas>).

Palladino C, Pérez G, Pérez CA (2016). Enfermedades bacterianas del eucalipto. Estado actual del conocimiento. *Bosque* 37(3): 451-460.

Pérez CA, Altier N, Simeto S, Wingfield MJ, Slippers B & Blanchette R (2008). Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay. *Agrociencia* v. XII 2, p. 12: 19-30.

Pérez CA, de Beer ZW, Altier N, Wingfield MJ and Blanchette RA (2008) b. Discovery of the eucalypt pathogen *Quambalaria eucalypti* infecting a non-*Eucalyptus* host in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 37:600-604.

Pérez CA, Wingfield MJ, Altier N & Blanchette RA (2009) a. A Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae associated with *Eucalyptus* leaf diseases and stem cankers I Uruguay. *For. Path.* 39: 349-360.

Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier N & Blanchette R A (2009) a. *Neofusicoccum eucalyptorum* a *Eucalyptus* pathogen on native Myrtaceae in Uruguay. *Plant Pathol* 58: 964-970.

Pérez G, Hunter GA, Slippers B, Pérez CA, Wingfield BD & Wingfield M J (2009) b. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of *Mycosphaerella* leaf disease (MLD) recently introduced into Uruguay. *Eur. J. Plant. Pathol* 125:109–118.

Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier N, Blanchette RA 2010. Endophytic and canker associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Diversity* 41:53-69.

Pérez CA, Wingfield MJ, Altier N, Simeto S, Blanchette RA (2011). *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay. *Mycological Progress* 10: 273- 282.

Pérez CA, Wingfield MJ, Altier N, Blanchette RA (2013). Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae species on native Myrtaceae in Uruguay: Evidence of fungal host jumps. *Fungal Biology* 117:94-102.

Porcile JF (2007). Crónicas del desarrollo forestal del Uruguay. Ed. Fin de Siglo, Montevideo. 132pp.

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

Simeto S, Balmelli G, Pérez CA (2020). Diseases of *Eucalyptus* plantations in Uruguay: Current state and management alternatives. In Estay, S. 2020. Forest Pest and Disease Management in Latin America. Modern Perspective in natural forests and exotic plantations. Pp. 123-144. Springer. Cham, Switzerland. ISBN 978-3-030-35142-7. ISBN 978-3-030-35143-4 (eBook).

Soria S, Alonso R, Bettucci L & Lupo S (2014). First report of *Teratosphaeria pseudoecalypti* in Uruguay. *Australasian Plant Disease Notes*. 9:146.

Van Hoff E (2001). Estado actual del manejo forestal en Uruguay. FAO, 38pp

Uruguay XXI (2020). Informe anual de comercio exterior, 2019 (<https://www.uruguayxxi.gub.uy>).

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

Capítulo 1

Hongos endófitos y asociados a síntomas de acículas y ramas pequeñas de *Pinus taeda* y *Pinus elliotti*

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de las plantas establecen asociaciones con hongos endófitos. Estos constituyen un grupo diverso que impacta en las comunidades de plantas, en muchos casos, aportando beneficios a las plantas hospederas, incrementando la biomasa, confiriéndoles mayor tolerancia al estrés abiótico y biótico.

Después de más de 100 años de investigación en el tema, se sugiere que todas las plantas en ecosistemas naturales tienen asociaciones simbióticas con hongos micorrícicos y/o endófitos (Petrini 1986). Estos simbiosomas fúngicos son muy importantes en la ecología, adaptación y evolución de las plantas hospedantes (Brundrett 2006), moldeando las comunidades de éstas (Clay & Holah 1999).

Contrariamente a lo que sucede con los hongos micorrícicos, que colonizan la rizosfera e infectan parte de los tejidos radiculares, los hongos endófitos viven completamente dentro de los tejidos de la planta, de raíces, tallos y hojas. Son hongos que pasan parte o todo su ciclo de vida en los espacios intercelulares de los tejidos vivos y sanos del hospedante mientras estos tejidos permanecen intactos y funcionales (Petrini 1991, Wilson 1995, Hyde & Soyong 2008). Se desarrollan saprofiticamente y esporulan cuando los tejidos se vuelven senescentes (Sherwood & Carroll 1974, Carroll 1988, Stone *et al.* 2004).

Tradicionalmente se reconocían dos grupos principales de hongos endófitos basados en la taxonomía, en las plantas hospedantes y en sus funciones ecológicas: los clavicipetáceos (C-endófitos) que infectan las gramíneas y los no-clavicipetáceos (NC-endófitos) que se encuentran asintóticamente en diversos grupos de plantas como los helechos, hepáticas, musgos, coníferas y angiospermas (Rodríguez *et al.* 2009). Durante muchos años, la mayoría de los trabajos se han centrado en los C-endófitos (Clay & Schardl 2002), debido probablemente a la importancia económica del cultivo de gramíneas. Los C-endófitos producen infecciones intercelulares sistémicas en la planta (Clay 1990, Clay & Schardl 2002) y, en general, son transmitidos de forma vertical a nuevas plantas a través de las semillas (Saikkonen *et al.* 2002). En el caso de los NC-

endófitos, existe gran diversidad de especies pertenecientes a grupos filogenéticos diferentes, que, en su mayoría, corresponden a los Ascomycetes. Han sido aislados de gran diversidad de plantas en todos los biomas existentes y también en agroecosistemas, desde los trópicos a la tundra (Arnold & Lutzoni 2007). La colonización de los tejidos de la planta hospedante es discreta, con poco desarrollo de micelio y la transmisión es principalmente horizontal. Las esporas son liberadas y dispersadas por el viento y colonizan nuevas plantas hospedantes a través del ingreso por aperturas naturales o por la formación de estructuras de penetración. La mayoría de las especies de este tipo de endófitos pueden cambiar de modo de vida endofítica a saprofítica (Vasiliauskas *et al.* 2007). Son el tipo de endófito frecuentemente encontrado en las especies leñosas. Una nueva reclasificación de los hongos endófitos (Rodríguez *et al.* 2009) propone cuatro clases basadas en el rango de hospedero, especificidad por tejidos, tipo de transmisión y beneficios para la planta que los alberga (tabla 1.1).

Tabla 1.1 Clases de endófitos propuesta por Rodríguez *et al.* 2009

	Clavicipetaceos Clase I	No clavicipetaceo Clase II	No clavicipetaceo Clase III	No clavicipetaceo Clase IV
Rango de hospedero	Estrecho	Amplio	Amplio	Amplio
Tejidos colonizados	Tallo y rizoma	Tallo, rizoma, raíz	Tallo, Hoja	Raíz
Colonización de la planta	Extensiva	Extensiva	Limitada	Extensiva
Transmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Beneficios	NHA	NHA y HA	NHA	NHA
Biodiversidad en planta	baja	baja	alta	desconocida

NHA: No adaptación al hábitat. Confieren tolerancia al estrés hídrico y mejora crecimiento; HA: Adaptación al hábitat, les confiere beneficios frente a presiones selectivas del hábitat como pH, temperatura y humedad.

El estudio de los hongos endófitos de los árboles en bosques se ha incrementado en el correr de los años y se han realizado numerosos trabajos sobre estos organismos (Guo *et al.* 2003, Hoff *et al.* 2004, Saikkonen *et al.* 2004, Arnold 2007, Saikkonen 2007, Ganley & Newcombe 2006, Hoffman & Arnold 2008, Slippers & Wingfield 2007, Sieber 2007). Las especies de endófitos cohabitan con patógenos y saprofitos en los bosques, incluso una misma especie puede evolucionar en diferentes estrategias de vida como resultado de variaciones ambientales (Carroll 1988, Sieber 2007). Por lo tanto, conocer la diversidad y función de los endófitos es esencial para establecer sus implicancias en el bosque (Arnold 2007).

La diversidad de endófitos depende de la identidad del hospedero (Higgins *et al.* 2007) y de la ubicación geográfica (Carroll *et al.* 1978, Fisher *et al.* 1993), además está fuertemente determinada por condiciones climáticas locales (Arnold & Herre 2003) incluso en plantaciones monoespecíficas (Fisher *et al.* 1993). Se ha demostrado que en los bosques altamente diversos de los ecosistemas tropicales es donde se da la mayor riqueza de especies endófitas y la menor especificidad por el hospedante (Arnold *et al.* 2000, Fröhlich *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2008).

El laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias inició, hace algunos años, estudios sobre las comunidades de hongos endófitos y de problemas fitosanitarios en plantaciones de *Eucalyptus globulus* y *E. grandis* efectuando un monitoreo intensivo en el litoral oeste, centro y este del país (Alonso *et al.* 2009, Bettucci & Saravay 1993, Bettucci & Alonso 1997, Bettucci Alonso & Fernández 1997, Bettucci Alonso & Tiscornia 1999 *a, b*, Bettucci *et al.* 2004, Simeto *et al.* 2005). A partir de estos trabajos fue posible conocer los hongos endófitos de estas especies plantadas y establecer el efecto de los factores ambientales en la generación de los síntomas presentes. También estos estudios permitieron evaluar la real función de la micobiota asociada a los mismos (Alonso *et al.* 2005, Alonso 2004).

Debido a que las especies del género *Pinus* constituyen un recurso intensamente plantado en el país, se consideró necesario iniciar un estudio fitosanitario en las áreas donde han sido más intensamente plantadas, en particular, en el centro y centro-norte del país.

El estudio de los hongos endófitos es necesario para la determinación de las especies presentes y su posible relación con especies potencialmente patógenas. El estudio de hongos endófitos de *Pinus* y otras coníferas ha comenzado a ser documentada a partir de hace más de cuatro décadas. Carroll *et al.* (1977) y Carroll & Carroll (1978) investigaron

la composición del conjunto de especies endofíticas de acículas de numerosas especies de pinos. Desde entonces, se ha progresado mucho en relación con la especificidad por el hospedante (Leuchtmann *et al.* 1992, Petrini 1986, 1991, Hata & Futai 1995, 1996, Stanosz *et al.* 1997, Sieber *et al.* 1999, Ganley, Brunfeld & Newcombe 2006). En cuanto a la distribución de los endófitos dentro de una misma acícula, se ha observado que la mitad distal contiene mayor nivel de infección que la mitad proximal (Deckert & Peterson 2000).

Luego que los endófitos ingresan al hospedero, la fase críptica endofítica está caracterizada por ser de crecimiento lento, confinado a la laminilla media entre la epidermis e hipodermis con una gradual adquisición de reservas necesarias para permitir la rápida colonización de la acícula y el desarrollo de las estructuras reproductivas al comienzo de la senescencia (Deckert *et al.* 2001).

Las especies de *Lophodermium*, son endófitos frecuentes en numerosas coníferas, colonizan las acículas sanas de forma asintomática y solo desarrollan sus estructuras reproductoras luego de la abscisión de las acículas (Deckert *et al.* 2001). Por otra parte, existen especies patógenas como *L. seditiosum* que causa severos daños en las acículas, con importantes pérdidas en plántulas de vivero y arboles adultos (Minter & Millar 1980, Sinclair *et al.* 1987) afectando más de 40 especies de hospederos (Ortiz-García *et al.* 2003).

Por otra parte, la micobiota de ramas pequeñas de *Pinus* (Petrini & Fisher 1988) ha sido menos investigada, aunque se dispone del conocimiento de la micobiota en otras coníferas (Kowalski & Kehr 1992, Sieber 1989, Barklund & Kowalski 1996, Deckert *et al.* 2001).

Pinus taeda y *Pinus elliotti* son las dos especies de coníferas económicamente más importantes plantadas en forma extensiva en Uruguay. Si bien se cuenta con poca información sobre la incidencia de problemas fitosanitarios en las plantaciones, se han registrado enfermedades como la banda roja producida por *Dothistroma pini* Hulbary (*Mycosphaerella pini*, Rostr.) (Bettucci & Guerrero 1970 a, FAO 2006), muerte y manchas de acículas causadas por *Hypoderma desmazieri* Duby (*Meloderma desmazieri*, (Duby) Darker) (Bettucci & Guerrero 1970 b, FAO 2005). También se ha registrado marchitamiento y muerte apical del vástago por *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton (Koch de Brotos *et al.* 1981), uno de los patógenos más comunes y ampliamente distribuidos entre las coníferas.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio fitosanitario en plantaciones de *Pinus* spp: hongos endófitos y asociados a lesiones.

Objetivo específico 1

Caracterizar la composición de la micobiota endofítica de acículas y ramas sanas de *Pinus taeda* y *Pinus elliottii*.

Objetivo específico 2

Caracterizar la micobiota asociada a síntomas presentes en acículas de ambas especies de *Pinus*.

Los estudios planteados en los objetivos específicos 1 y 2 se analizaron en las mismas plantaciones por lo que se describirán en conjunto el área de estudio y los materiales y métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

La prospección fue realizada en los Departamentos de Rivera, Tacuarembó y Durazno.

En el Departamento de Rivera se seleccionó una plantación de 8 años compuesta por *Pinus taeda* y *P. elliotti* localizada en la Ruta 27 rumbo a Vichadero.

Se observó el aspecto general de los árboles, se determinó la presencia de síntomas en acículas. Se seleccionaron 100 árboles al azar y se tomaron muestras de acículas asintomáticas de 10 árboles de *P. taeda* y 10 de *P. elliotti*.

De manera similar, se tomaron muestras de acículas que presentaban manchas o bandas de decoloración. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno, refrigeradas y procesadas dentro de las 24 horas.

En el Departamento de Tacuarembó se seleccionó una plantación de 10 años, compuesta fundamentalmente por *P. taeda* y en menor proporción *P. elliotti*, localizada sobre la ruta 5, Km 419. En esta plantación se había realizado un raleo debido al ataque de la avispa

de la madera (*Sirex noctilio*). En parcelas de *P. taeda*, se observaron manchas foliares que formaban bandas amarillo rojizas a lo largo de las acículas. Se tomaron muestras de acículas asintomáticas de 10 árboles de *P. taeda* y 10 de *P. elliotii* de un total de 100 árboles seleccionados al azar. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno, refrigeradas y procesadas dentro de las 24 horas.

Al mismo tiempo se tomaron muestras de ramitas, para el aislamiento de hongos endófitos de corteza y xilema.

También se efectuó una prospección en el huerto semillero de *P. elliotii* y *P. taeda*, perteneciente al INIA de Tacuarembó ubicado en la Ruta 5 Km 386, donde los árboles presentaban, en las acículas, una alta incidencia de manchas en forma de bandas color amarillo rojiza. Se tomaron muestras de estas acículas y fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno, refrigeradas y procesadas dentro de las 24 horas como en los casos anteriores para al aislamiento de hongos.

En el Departamento de Durazno se seleccionó una plantación joven de un año de *Pinus taeda* instalada en un campo sin antecedentes de forestación y sin plantaciones de pino cercanas. Las plantas en general presentaban buen desarrollo. Un problema de menor incidencia detectado fue la presencia de pulgón (*Cinara atlantica*) afectando los ápices del vástago. En esta plantación se inspeccionaron 100 plantas y se tomaron muestras de acículas de un año y de 2-3 meses a fin de evaluar la comunidad de hongos endófitos en plantas jóvenes.

Aislamiento de hongos endófitos

Para el aislamiento de los hongos endófitos, las acículas colectadas se lavaron con Tween 0.05 % y luego se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en etanol 80% durante 1 min, en hipoclorito de sodio 4% durante 5 min y se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril (Deckert, Melville & Peterson 2001). Se cortaron las acículas en 3 secciones correspondiendo a las porciones basal, media y distal a partir de la base donde se encuentra la vaina (Hata & Futai 1995). Se sembraron estos segmentos en placas de Petri conteniendo agar-extracto de malta al 2% con cloranfenicol (0.1g/L). Se colocaron los segmentos correspondientes a 3 acículas por placa. En total se sembraron 100 acículas asintomáticas de *P. taeda* y 100 acículas de *P. elliotii* de cada sitio muestreado. Se incubaron en estufa a 25° C por 5 a 10 días. Para verificar la eficiencia de la desinfección

superficial, previamente a la incubación, se colocaron segmentos del material a estudiar desinfectados por el método descrito presionándolos sobre medio de cultivo. Estos segmentos se dejaron durante 20 minutos y luego se retiraron. La ausencia de crecimiento indica que la desinfección fue eficiente y que los micelios que emergen de estos provienen de los tejidos internos.

Para el aislamiento de los hongos de ramas, se cortaron segmentos de 3-4 mm y se separó la corteza del xilema. Fueron desinfectados superficialmente con la misma metodología que las acículas, se sembraron en agar-extracto de malta y se incubaron a 25°C durante 7 días a 25° C.

En todos los materiales sembrados, se realizó el conteo y aislamiento de los hongos que emergieron de los segmentos en medio agar-extracto de malta 2% para su posterior identificación. Los cultivos se incorporaron en el cepario del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias.

Aislamiento de hongos asociados a síntomas

Las acículas que presentaban síntomas en forma de bandas amarillo-rojizas fueron desinfectadas superficialmente como se procedió para aislar los endófitos y se sembraron 100 segmentos correspondientes a los sectores con manchas provenientes de cada plantación (10 segmentos por placa). También se observaron bajo lupa los segmentos de acículas con síntomas y se colocaron en cámara húmeda para estimular la esporulación de los hongos asociados a ese síntoma.

Una vez que emergieron los hongos de todos los segmentos inoculados, se cuantificaron las colonias y se aislaron en cultivo puro para su posterior identificación. Se calculó la frecuencia de colonización y la abundancia relativa (AR) de algunas especies de interés de acuerdo con la fórmula $AR = (N.^{\circ} \text{ total de aislados o cepas de la especie} / N.^{\circ} \text{ total de aislados}) \times 100$

Identificación de las cepas aisladas

Se identificaron los hongos que fructificaron en medio de cultivo a nivel de género y/o especie basado en los caracteres macro y micromorfológicos siguiendo los métodos micológicos habituales (Sutton 1980, Ellis 1971, Barnett & Hunter 1998, Domsch, Gams & Anderson 1993). En el caso de los hongos que presentaron alta frecuencia y que permanecieron estériles o no se pudieron identificar por las características morfológicas, se los mantuvo en cultivo para su identificación por métodos moleculares a través de la extracción y amplificación del DNA ribosomal (región ITS) mediante PCR y su posterior secuenciación y comparación con las secuencias registradas en GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La extracción del ADN se realizó a partir de micelio utilizando el protocolo de Lee & Taylor (1990) que utiliza CTAB. La amplificación de la región ITS se realizó utilizando los primers ITS4 (5'-tctccgcttattgatatgc-3') e ITS 5 (5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3') sobre aislados representativos de cada grupo morfológico (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción contenía 2.5 µl de Buffer 10X, 2.5 µl de dNTPs (2.5mM), 1.5 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de cebador1 (10µM), 0.5 µl de cebador2 (10µM), 0.25 µl de Taq polimerasa, 15.25 µl de agua MQ y 2 µl de la muestra de ADN, la amplificación se realizó en 25 µl de volumen final. El control negativo se realizó utilizando la misma mezcla, pero sin el agregado de ADN. La amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización (30 s a 94°C), annealing 30 s a 50 °C, extensión (1 min. a 72°C) seguidos de una extensión final de 10 min. 72°C y 5 min. a 42°C. Se secuenciaron las dos hebras de ADN con los mismos primers, y ambas secuencias fueron alineadas y corregidas manualmente utilizando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Por último, se realizó un análisis filogenético de las secuencias pertenecientes a los aislados de los grupos taxonómicos de interés por su posible patogenicidad para identificar las especies. Para ello, las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) usando los siguientes parámetros: *pairwise alignment gap opening* = 10, *gap extensión* = 0.1 y *multiple alignment gap-opening* = 10, *gap extensión* = 0.2, *delay divergent sequences* = 25% y *transition weight* = 0.5. Los alineamientos fueron corregidos y ajustados manualmente mediante en MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). Los análisis filogenéticos fueron realizados en MEGA4 (Tamura *et al.* 2007), para lo cual se utilizaron diferentes especies como raíz, dependiendo del género tratado. Los caracteres fueron

desordenados y considerados de igual peso. Los valores de *Bootstrap* expresados en los árboles, fueron obtenidos de realizar 1000 réplicas de *bootstrap* luego de la obtención de árboles por el método de *Neighbor-Joining*.

RESULTADOS

Endófitos

En las muestras provenientes de las plantaciones de Rivera, de los 300 segmentos incubados se obtuvieron 257 aislados correspondientes a 27 taxa en *Pinus elliotti*. En *P. taeda* se obtuvieron un total de 259 aislados correspondientes a 15 taxa. En ambas especies de pinos los hongos dominantes fueron *Lophodermium australe* y especies pertenecientes a la familia Xylariaceae. La abundancia relativa de *Lophodermium* fue de 36% en *P. elliotti* y de 64% en *P. taeda*; en tanto la de las Xylariaceae fue de 21% y 27% respectivamente. Se observaron diferencias en la distribución de los endófitos en las tres porciones de las acículas estudiadas, siendo la colonización en la porción basal menor que en la porción media y distal (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Frecuencia de colonización por endófitos en segmentos basal, medio y distal de 100 acículas asintomáticas de *Pinus elliotti* y *Pinus taeda* en el Departamento de Rivera

Especie y/o número de cepa	N.º de aislados/100segm. <i>Pinus elliotti</i>			N.º de aislados/100segm <i>Pinus taeda</i>		
	Basal	Medio	Distal	Basal	Medio	Distal
<i>Acremonium kiliense</i>				1		
<i>Alternaria alternata</i>		1	6			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5	3	2			1
<i>Coelomycete con espermacio</i>				1	1	1
<i>Didymosphaeria igniaria</i>		3	1			
<i>Dreschlera raveneli</i>					1	
<i>Epicoccum purpurascens</i>		1				1
<i>Fusarium anthophilum</i>			1			
<i>Fusarium subglutinans</i>	1					
<i>Geotrichum candidum</i>	1	1	1			
<i>Lophodermium australe</i>	16	35	42	14	57	95
Micelio estéril E1'	3	3	1			
Micelio estéril E16			1			
Micelio estéril E2	2	12	21			
Micelio estéril E28	1					
Micelio estéril E3		2				
Micelio estéril E31			1			
Micelio estéril E5'			1			
Micelio estéril T15						1
Micelio estéril T19						1
Micelio estéril T22					1	
Micelio estéril T26					1	1
<i>Nigrospora sp.</i>		1	1	1		
<i>Nigrospora oryzae</i>				1	3	5
<i>Nigrospora sphaerica</i>		1				
<i>Nodulisporium sp.</i>			1			
<i>Phoma sorghina</i>	1	10	13			
<i>Scytalidium</i>						1
<i>Torula sp.</i>			2			
<i>Trichoderma</i>	1		1			
<i>Ulocladium botrytis</i>		1	1			
<i>Xylaria arbuscula</i>			2			
<i>Xylaria enteroleuca</i>		4	3	1		1
<i>Xylaria longipes</i>	2	2				
<i>Xylaria polimorpha</i>		1	1			
<i>Xylaria spp.</i>	2	19	19	4	25	39
Total de aislados	35	100	122	22	90	147

En las muestras de Tacuarembó, de los 300 segmentos incubados se obtuvieron 247 aislados correspondientes a 16 taxa en *P. elliotti*. En *P. taeda* se obtuvieron 263 aislados correspondientes a 17 taxa. En estas plantas la especie dominante correspondió a *Lophodermium australe* con una abundancia relativa de 81% en *P. taeda* y 59% en *P. elliotti*. En cambio, las Xylariaceae presentaron una frecuencia mucho menor que en las otras plantaciones (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Frecuencia de colonización por endófitos en segmentos basal, medio y distal de 100 acículas asintomáticas de *P. elliotti* y *P. taeda* en el Departamento de Tacuarembó

Especie y/o número de cepa	N.º de aislados/100segm			N.º de aislados/100segm		
	<i>Pinus elliotti</i>			<i>Pinus taeda</i>		
	Basal	Medio	Distal	Basal	Medio	Distal
<i>Alternaria alternata</i>	22	2	5	7	1	
<i>Arthrinium sphaerospermum</i>			2	1		
<i>Botryosphaeria</i> 416			1			
<i>Cenangium ferruginosum</i>		1	2			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10	2	1	7		
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>				4		
<i>Epicoccum purpurascens</i>	5			9	1	
<i>Hormonema dermatioides</i>	5		1			
<i>Lophodermium australe</i>	6	56	83	20	149	45
Micelio estéril 402		2				1
Micelio estéril 406		1				
Micelio estéril 409	2	9	15	1		1
Micelio estéril 410			2			
Micelio estéril 421		2				
Micelio estéril 423			1	1		
Micelio estéril 430				1		1
Micelio estéril 434				1		
Micelio estéril 438						1
<i>Nigrospora</i> sp.	1	2	1		1	
<i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>s. guepini</i>		1	1	5		
<i>Pestalosphaeria</i>				1		1
<i>Phomopsis archeri</i>					1	
Xylariaceae		3			2	
Total de aislados	51	81	115	58	155	50

En la plantación de *Pinus taeda* más joven (1 año) de Durazno, se observaron diferencias en la colonización de las acículas con respecto a las plantaciones de 8 años o más estudiadas. Las diferencias fueron en el número de taxa encontrados y en la frecuencia de aislados de éstos. En general la frecuencia de colonización fue menor y las especies fueron cosmopolitas. En las acículas de 3 meses, se obtuvieron 126 aislados correspondientes a 25 taxa, siendo *Anthostomella eucalyptorum* y otras Xylariaceae los dominantes con 33% de abundancia relativa y *Cladosporium cladosporioides* con 23%. En las acículas de un año se obtuvieron 140 aislados correspondientes a 22 taxa, siendo *Alternaria alternata*, *Phoma* sp. y *C. cladosporioides* las especies más frecuentes (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Frecuencia de colonización por endófitos de 100 acículas de 3 meses y 100 de 1 año de *Pinus taeda* en plantación del Departamento de Durazno.

Especie y/o número de cepa	N.º de aislados/100segm	
	3 meses	1 año
<i>Alternaria alternata</i>	2	32
<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	34	
<i>Aureobasidium pulullans</i>	12	4
<i>Chaetomium cupreum</i>		4
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	30	17
<i>Curvularia pallescens</i>		2
<i>Curvularia protuberata</i>		8
<i>Curvularia</i> sp.	2	
<i>Epicoccum purpurascens</i>		3
<i>Fusarium equiseti</i>		1
<i>Geniculosporium</i> sp.	1	4
<i>Geotrichum candidum</i>		3
Micelio estéril 1'	2	
Micelio estéril 10	2	
Micelio estéril 11		1
Micelio estéril 12	1	
Micelio estéril 13		8
Micelio estéril 15		3
Micelio estéril 17	1	
Micelio estéril 2	9	
Micelio estéril 21	1	2
Micelio estéril 23	1	5
Micelio estéril 25	1	1
Micelio estéril 3	1	1
Micelio estéril 4	3	3
Micelio estéril 6	2	
Micelio estéril 7	4	
Micelio estéril 8	1	
Micelio estéril 9	3	
Micelio verde oscuro estéril		3
<i>Mycrodochium bollieri</i>	1	
<i>Phoma sorghina</i>		28
<i>Phomopsis</i> sp. 22		1
<i>Scytalidium</i> sp.	3	
<i>Sordaria</i> sp.	1	
<i>Verticillium catenulatum</i>	1	
Xylariaceae	7	6
Total aislados	126	140

Del total de taxa obtenidos, las Xylariaceae en su conjunto fueron colonizadores frecuentes, los cultivos permanecieron estériles y se determinaron los géneros y especies a partir de las secuencias de ITS. La mayor parte correspondió al género *Xylaria* (Figura 1.1) siendo *Xylaria enteroleuca* la especie más frecuente.

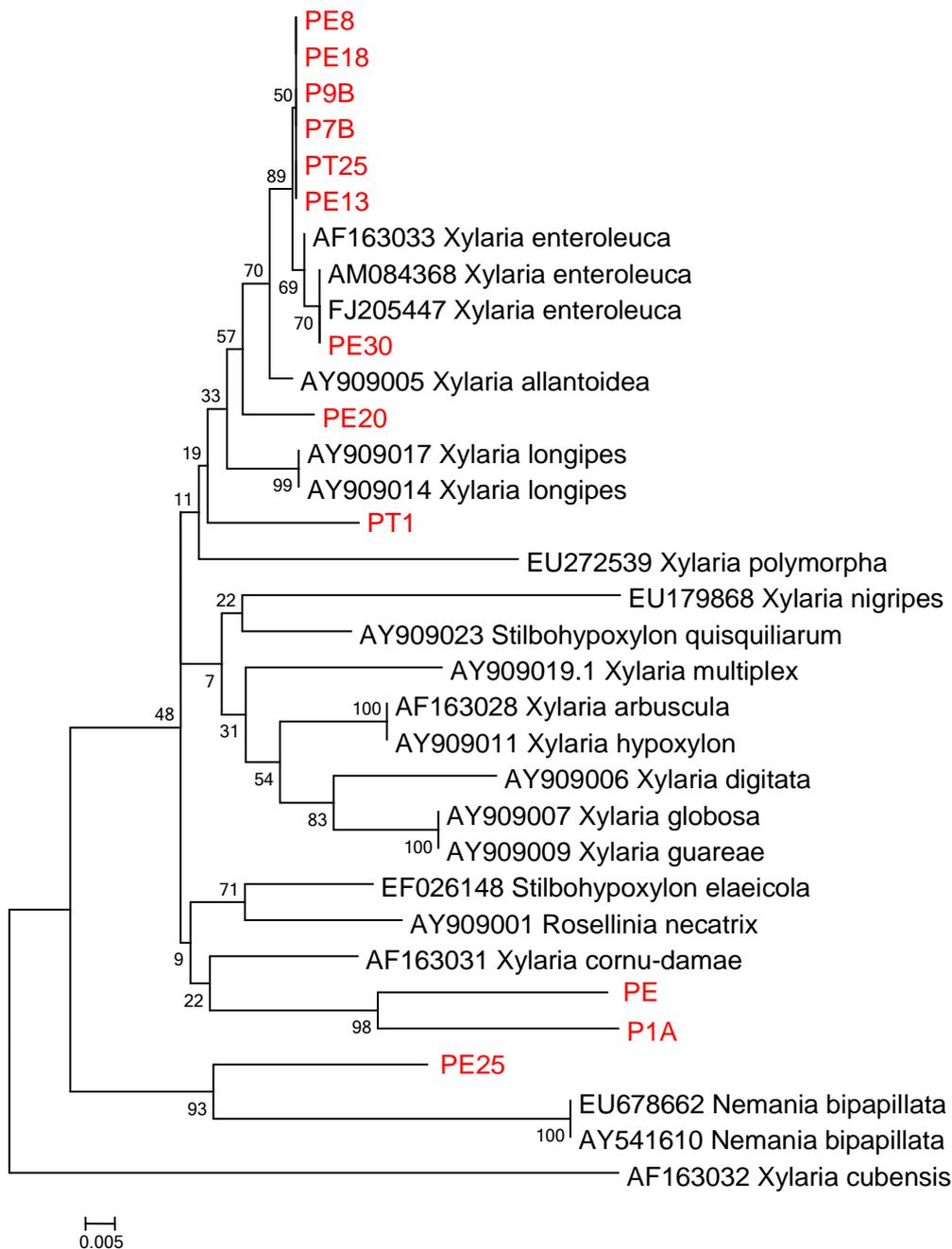


Figura 1.1. Árbol resultante del análisis de las secuencias obtenidas de los aislados de Xylariaceae. En rojo están indicadas las cepas provenientes de este estudio. Números en los nodos representan valores de Bootstrap de 1000 réplicas. Códigos junto al nombre de la especie representan accesiones de GenBank.

Endófitos de ramas

En cuanto a la composición de hongos endófitos de ramas sanas se encontró que la corteza presentaba mayor cantidad y diversidad de hongos como es frecuente en otras especies arbóreas, mientras que en el xilema la frecuencia de colonización fue menor, siendo *Phaeomoniella* sp. la especie más frecuente (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Frecuencia de colonización por endófitos de rama (corteza y xilema)

Especie y/o número de cepa	<i>Pinus elliotti</i>		<i>Pinus taeda</i>	
	Corteza	xilema	Corteza	xilema
<i>Acremonium kiliense</i>			2	
<i>Alternaria alternata</i>	4		2	
<i>Alternaria longissima</i>			3	
<i>Aureobasidium</i> sp.T250			14	
<i>Botryosphaeria</i> sp.T251			18	
<i>Cenangium ferruginosum</i>			1	
<i>Cladosporium herbarum</i>	5			
Coelomycete c/espermacios	1			
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	1			
<i>Curvularia</i> sp.			4	
<i>Dichomera</i> sp.			7	
<i>Drechslera rostrata</i>			6	
E202	1			
E203	5			
E204	12			
E205	1			
E210	4			
E211	1			
E214	1			
E214'	3			
E220	2			
E221	1			
E222	1			
E224	1			
E304		1		
E305		1		
E307		1		
<i>Epicoccum purpurascens</i>			3	
<i>Hormonema dematioides</i>			12	
<i>Lophodermium australe</i>	3	1		
<i>Microsphaeropsis conielloides</i>			4	
<i>Nigrospora sacchari</i>			2	
<i>Pestalotipsis guepini</i>	2		3	
<i>Phaeomoniella</i> sp.		29		13
<i>Phomopsis</i> sp.	10		4	
<i>Sporobolomyces roseum</i>			20	
T263			7	
T266			45	
T267			2	
T268			1	
T312				2
T313				1
T314				1
<i>Trimmetostroma</i> sp.	3			
Xylariareaceae	13		1	
Total de aislados	75	33	161	17

La colonización endofítica en el xilema de ramas, fue relativamente baja 33% en *P. elliotti* y 17% en *P. taeda* y el hongo aislado casi exclusivamente fue *Phaeomoniella* sp. Las características morfológicas (Figura 1.2) no permitieron llegar a su identificación y al complementar con los datos moleculares no se logró la determinación a nivel de especie (Figura 1.3).

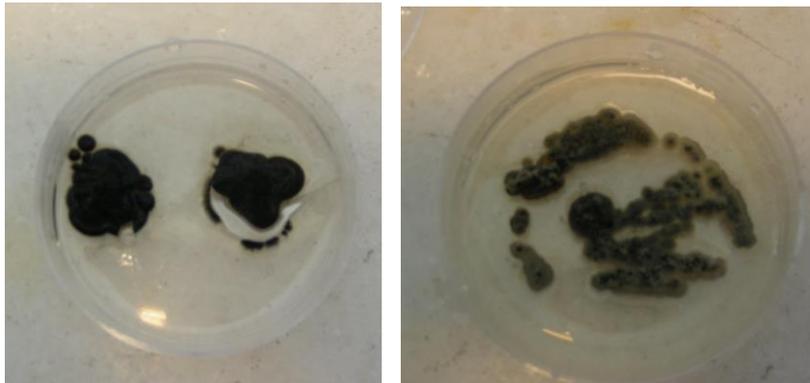


Figura 1.2. Cultivos de *Phaeomoniella* sp. sobre PDA.

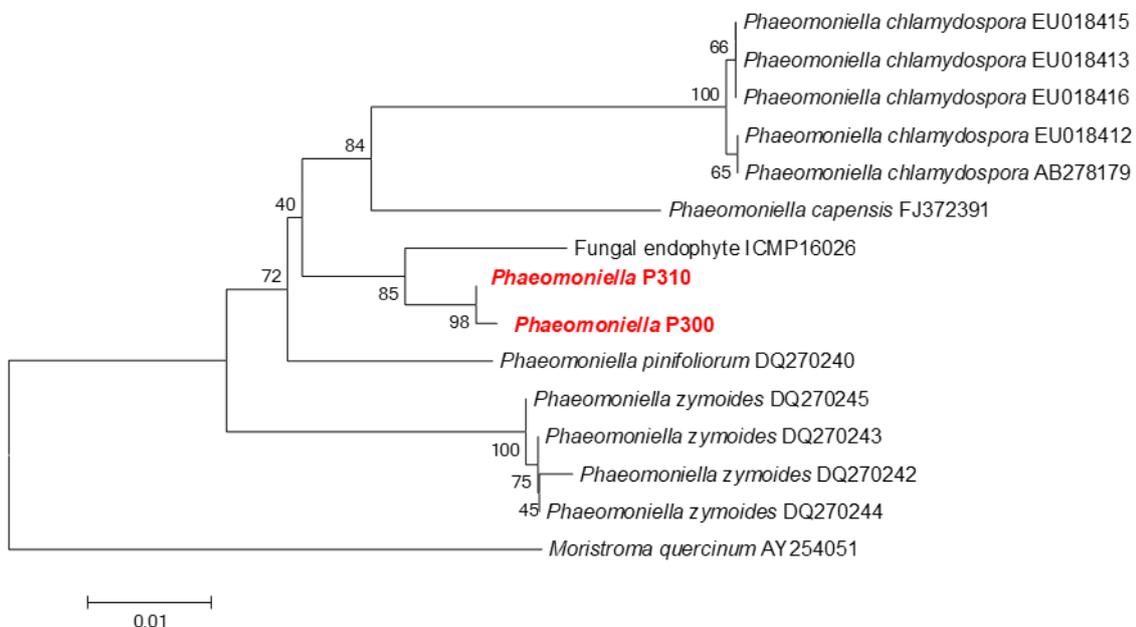


Figura 1.3. Árbol obtenido del análisis filogenético de secuencias de provenientes de algunos de los aislados de *Phaeomoniella* obtenidos de xilema de ramitas. En rojo están indicadas las cepas obtenidas en este estudio. Números en los nodos representan valores de Bootstrap de 1000 réplicas

Hongos asociados a síntomas en acículas

De los segmentos de las acículas que presentaban bandas con una coloración amarillo-rojiza se obtuvo una diversidad baja de hongos, donde la especie dominante asociada al síntoma fue *Lophodermium australe* (Figura 1.4) con un 93% de colonización en *P. taeda* y 66% en *P. elliotti* (Tabla 1.6, 1.7).



a

b

Figura 1.4 a- acículas con manchas en banda amarillo rojizas b-micelio proveniente de los segmentos correspondientes a las manchas sobre PDA.

Tabla 1.6. Frecuencia de colonización de hongos presentes en segmentos con síntomas de acículas de *P. elliotti* y *P. taeda* en el Departamento de Rivera

Especie y/o número de cepa	N° de aislados	
	<i>Pinus elliotti</i>	<i>Pinus taeda</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	1
<i>Curvularia brachyspora</i>	1	
<i>Epicoccum purpurascens</i>	1	
<i>Lophodermium australe</i>	59	100
Micelio estéril E2	1	
Micelio estéril E3	18	
Micelio estéril E4	6	
<i>Phialophora E8</i>	1	
<i>Sporotrix sp. T23</i>		1
<i>Sporotrix sp. T24</i>		1
Xylariaceae E7	1	
Xylariaceae T25		4
Total de segmentos	100	100
Total de aislados	90	107

En las acículas sintomáticas pertenecientes al huerto semillero de INIA Tacuarembó, la especie dominante fue *L. australe* con una abundancia relativa de 82% en *P. taeda* y 30% en *P. elliotti* (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Frecuencia de colonización de hongos presentes en segmentos de acículas sintomáticas de *P. elliotti* y *P. taeda* en el Departamento de Tacuarembó

Especie y/o número de cepa	N° de aislados	
	<i>Pinus elliotti</i>	<i>Pinus taeda</i>
<i>Alternaria alternata</i>	12	
<i>Aureobasidium pulullans</i>	21	1
<i>Curvularia pallescens</i>	3	
E103		6
E110		2
<i>Epicoccum purpurascens</i>	2	
<i>Hormonema</i> T162	7	
<i>Lophodermium australe</i>	30	97
Micelio hialino esteril E109		2
<i>Nigrospora</i>	3	
<i>Periconia bissoides</i>		3
T153	3	
<i>Xylaria</i> E107		7
Total de aislados	81	118

El género más frecuentemente encontrado, asociado tanto a tejidos sanos como con síntomas, fue *Lophodermium*. Todos los cultivos estudiados produjeron solo esporas asexuales (conidios) luego de un período de incubación de 20 días con alternancia de luz/oscuridad. No obstante, se observaron diferencias leves en los caracteres morfológicos de los aislados obtenidos en los materiales analizados, tanto en la morfología de la colonia como en la cantidad de micelio aéreo y en la ausencia o presencia de pigmentación color amarillo-castaño en el reverso de la colonia.

La similitud de los caracteres micromorfológicos del anamorfo (forma asexuales) no permitieron discriminar entre especies. Las estructuras de reproducción sexual no se obtuvieron en cultivo ni se pudieron observar en estado maduro del material colocado en cámara húmeda mientras que, en las acículas recogidas del suelo con fructificaciones viejas, ya se habían liberado las esporas.

A partir del análisis filogenético se determinó que los aislados de *Lophodermium* obtenidos forman un grupo cercano a *Lophodermium australe*, *L. conigenum* y otro grupo cercano a *L. kumaunicum* (Figura 1.5).

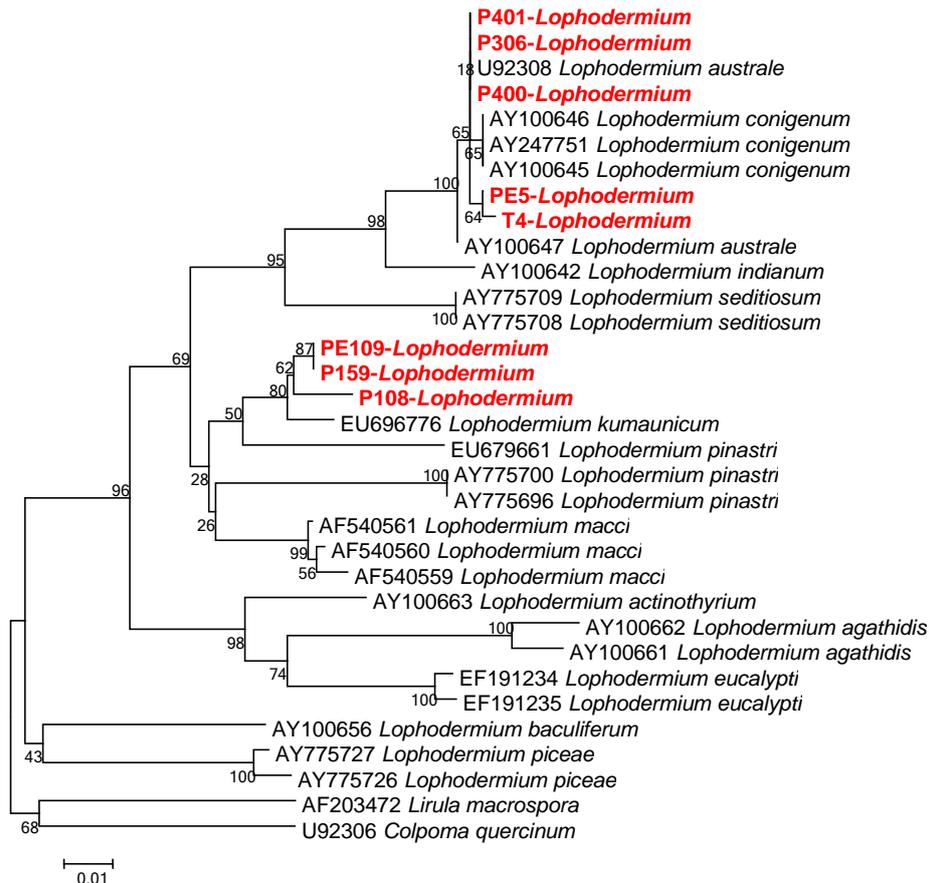


Figura 1.5. Árbol obtenido del análisis de las secuencias correspondientes a algunos de los aislados de *Lophodermium* provenientes tanto en acículas sintomáticas como asintomáticas. En rojo están indicadas las cepas obtenidas en este estudio. Números en los nodos representan valores de Bootstrap de 1000 réplicas. Códigos junto al nombre representan accesiones de GenBank.

En síntesis, no se observó diferencias importantes entre la composición de la microbiota que coloniza las acículas con y sin síntoma en ambas especies de pino.

En cambio, se comprobó que existen diferencias en la micobiota endofítica de las distintas porciones de las acículas (basal, medio y distal) y esta diferencia es más marcada en las acículas más jóvenes analizadas (Tabla 1.7).

Por otra parte, la comunidad de hongos presentes en ramas estaba compuesta por especies diferentes a las encontradas en acículas.

Tabla 1.7. Cuadro comparativo de los resultados de aislados totales y taxa obtenidos en todos los muestreos

Muestreo	Porción de acícula o tejido analizado				
		<i>Pinus elliotti</i>		<i>Pinus taeda</i>	
		Nº de taxa	Nº de aisl.	Nº de taxa	Nº de aisl.
Rivera	B	11	35	6	22
Acículas	M	17	100	8	90
Sin síntoma	D	21	122	11	147
	Total	27	257	15	259
<hr/>					
Tacuarembó	B	7	51	12	58
Acículas	M	11	81	6	155
Sin síntoma	D	12	115	6	50
	Total	16	247	17	263
<hr/>					
Con síntoma		10	81	7	118
<hr/>					
Durazno (1 año)	B			16	50
Acículas	M			15	43
Sin síntoma	D			14	47
	Total			22	140
<hr/>					
Durazno (3 meses)	B			3	4
Acículas	M			11	54
Sin síntoma	D			19	68
	Total			25	126
<hr/>					
Tacuarembó	Corteza	21	75	21	161
Ramas endófitos	Xilema	5	33	4	17
	Total	25	108	25	178

DISCUSIÓN

El número de taxa obtenidos de cada tejido analizado en este estudio, confirma que los hongos endófitos de los árboles plantados fuera de su área de distribución natural tienen diferente composición y menor diversidad que los de su área de origen (Espinosa-García & Langenheim, 1990, Fisher *et al.* 1993). Varios de los taxa endófitos de estas especies exóticas analizadas aquí, son los mismos que los encontrados en plantas nativas (Bettucci *et al.* 2004). Más aún, muchas de las especies encontradas como endófitas de ramitas y acículas son especies cosmopolitas. Sin embargo, la especie más abundante presente en las acículas asintomáticas y sintomáticas en las plantaciones adultas fue *Lophodermium australe*. Las especies de *Lophodermium* son endófitos foliares frecuentes en coníferas, algunas saprótrofas y otras son patógenas (Tanney & Seifert, 2017, Arnold *et al.* 2007). *Lophodermium seditiosum* y *Lophodermium pinaster* son patógenos que causan *needle cast* en plantaciones de pino y han sido previamente registradas para Uruguay (FAO 2006), sin embargo, no fueron encontradas en este estudio. Algunas especies de *Lophodermium* endófitos cumplen un rol muy importante en mantener bajos los niveles de incidencia de especies patógenas ya que ocupan el mismo nicho y por lo tanto las excluyen. Este género, representa un buen ejemplo de especies muy relacionadas, pero ecológicamente diversas que colonizan un mismo recurso. Así, Minter *et al.* (1978), Minter & Millar (1980) y Minter (1981) han demostrado que las acículas de *Pinus sylvestris* en Escocia pueden ser colonizadas por un parásito primario (*Lophodermium seditiosum*) que causa grandes daños y pérdida de acículas tanto en viveros como en plantaciones jóvenes (Staley & Nicholls 1989, Butin 1995). Sin embargo, *P. sylvestris* también alberga *Lophodermium conigenum*, un colonizador de acículas dañadas y a dos especies endófitas, *Lophodermium pinastri* y *Lophodermium staleyi*. Estas especies de *Lophodermium* estrechamente relacionadas difieren ecológicamente no solo en relación con el tipo de tejido de la acícula en el que fructifican, sino también en términos de los meses en los que maduran y liberan esporas. Este sistema ofrece oportunidades para estudiar las interacciones que ocurren entre endófitos y parásitos que pueden contribuir a la resistencia a enfermedades en las plantas (Arnold *et al.* 2003).

Algunos de los aislados encontrados en este estudio mostraron poseer alta homología con *L. australe* y otros aislados con *L. kumanicum*, especies consideradas endófitas asintomáticas (Minter & Sharma, 1982) y dos aislados con *L. conigenum*.

Por otra parte, Ortiz-García *et al.* (2003) consideran que *Lophodermium* contiene especies endófitas y patógenas muy relacionadas. Algunos autores consideran que, en este género, la patogenicidad evolucionó a partir del endofitismo (Deckert, Melville & Peterson 2001). En el caso de las especies saprófitas sólo descomponen las acículas luego que se desencadena la senescencia. A medida que avanza el envejecimiento la velocidad de colonización por otras especies, también aumenta sugiriendo cambios fisiológicos en las acículas. Deckert *et al.* (2001) encontraron que la mayor parte del ciclo de vida de especies de *Lophodermium* transcurre como biotrofos activos y que en esta fase críptica endofítica el crecimiento es lento con una gradual adquisición de sustancias de reserva necesarias para permitir el desarrollo de las estructuras de reproducción. Estos endófitos, cuando los órganos de las plantas se vuelven senescentes, cambian de endofitismo obligado a saprofitismo facultativo (Sieber-Canavesi & Sieber, 1993). Yuan & Chen (2014) han señalado a los taxa de *Lophodermium* endófitos de hojas de *P. massoniana* como pioneros frecuentes que juegan un papel importante en la degradación del mantillo. Para ello, realizaron pruebas de descomposición *in vitro*, análisis cualitativos de las exoenzimas, celulasa y laccasa, y obtuvieron la amplificación de la secuencia parcial de los genes de la β -glucosidasa (GH3), laccasa, y celobiohidrolasa (GH7) de aislados de *Lophodermium* como indicadores de su actividad lignocelulolítica.

Otro grupo importante de endófitos encontrados aquí, fueron especies de *Xylaria* que son importantes descomponedores cuando las acículas devienen senescentes, como se ha encontrado en otras especies de *Pinus* (Guo *et al.* 2003). Sin embargo, la alta frecuencia que presentan en estos materiales es llamativa ya que este grupo de hongos es más comúnmente encontrado asociado a Angiospermas. Es de destacar que *X. enteroleuca* también es endófito dominante en especies nativas de Myrtaceae (Bettucci *et al.* 2004) y de *Illex paraguariensis* en el sur de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay (Takeda *et al.* 2003). Probablemente estos endófitos de plantas nativas constituyen una fuente de inóculo para las plantaciones de especies introducidas participando en la degradación de recursos lignocelulósicos ya que se caracterizan por tener una actividad celulolítica importante. La producción de esporas es común que ocurra en fructificaciones presentes en restos de residuos lignocelulósicos del mantillo. Existen numerosos trabajos sobre la importancia de los hongos del mantillo y suelo en el proceso de descomposición de restos vegetales. Los Basidiomycetes han sido considerados los descomponedores más efectivos por su capacidad de producir gran diversidad de lacasas y celulasas. Sin embargo, estudios

recientes indican que los Ascomycetes tienen una eficiencia similar en la descomposición del mantillo. Mas aun, existe evidencia que indica que los hongos endófitos actúan como descomponedores pioneros debido a su persistencia en los tejidos vegetales vivos, senescentes o muertos (Muller *et al.* 2001).

En cuanto a la distribución de los endófitos a lo largo de las acículas, tanto en las de *P. elliotti* como de *P. taeda*, la mitad distal presentó mayor colonización por endófitos, lo que confirma los resultados encontrados por Deckert & Paterson (2000). Ellos demostraron que la porción proximal de la acícula tiene una tasa de colonización significativamente menor que la distal. Esta distribución de los hongos endófitos podría estar relacionada a la arquitectura y fenología del desarrollo de las acículas (Wilson & Carroll 1994).

La diferencia encontrada en la composición y abundancia de endófitos en arboles de plantaciones adultas con respecto a la plantación más joven estudiada coincide con lo observado por Ono *et al.* (2015) quienes sugieren que la falta de inóculo proveniente de la canopia de árboles adultos, diferencias microambientales y diferencias innatas a la susceptibilidad entre arboles adultos y más jóvenes podrían explicar las diferencias observadas.

Por otra parte, en las ramitas, se observaron diferencias en la composición de especies con respecto a las acículas como es frecuente para otras especies arbóreas. Así mismo destacan las diferencias encontradas entre corteza y xilema de las ramas. En la corteza, se encontró mayor frecuencia de colonización y mayor diversidad que en el xilema. Esta diferencia probablemente se deba a las diferencias en el contenido de nutrientes y a la anatomía de los tejidos. El contenido de nutrientes en el xilema es más bajo que en el resto de los tejidos (Siebrecht *et al.* 2003, Yadeta & Thomma 2014), a su vez las paredes celulares altamente lignificadas de los tejidos que forman el xilema funcionan como una barrera a la colonización por hongos endófitos (Win *et al.* 2018)

Phaeomoniella sp. es el principal colonizador de xilema en ambas especies de pino. A partir del análisis filogenético realizado, es probable que los aislados obtenidos en este trabajo constituyan una nueva especie. El género *Phaeomoniella* contiene especies patógenas de *Vitis vinifera* (Abreo 2011, Crous & Gams 2000). Dos especies, *Phaeomoniella zymoides* y *Phaeomoniella pinifoliorum* fueron descriptas como epifitas

de pino (Lee *et al.*, 2006) y *Phaeomoniella effusa* como endófito de ramitas de *Pinus sylvestris* (Sanz-Ros *et al.* 2015). Otra especie de interés encontrada fue *Cenangium ferruginosum*, con baja frecuencia en acículas sanas y en la corteza de ramitas, es un hongo asociado a especies de *Pinus*. Es un endófito subcortical que puede desarrollarse como un patógeno activo si el árbol hospedante se encuentra en condiciones ambientales desfavorables, como heladas y sequías. Algunos estudios indican que puede matar los tejidos de la corteza y el cambium como acículas debilitadas durante el invierno y principios de primavera (Jurc *et al.* 2000, Ryu *et al.* 2018).

En síntesis, cabe destacar que los endófitos encontrados en las plantaciones con mayor número de años de establecidas son más específicos de coníferas que aquellos encontrados en la plantación más joven estudiada. Al mismo tiempo, los endófitos más frecuentes, especies de Xylariaceae y de *Lophodermium* asegurarían una descomposición eficiente de los residuos lignocelulósicos provenientes de las plantaciones. Por otra parte, la ausencia de especies patógenas podría estar relacionada con la exclusión por especies cogenéricas.

BIBLIOGRAFÍA

Abreo E (2011). Comunidad fúngica asociada a las enfermedades del tronco de la vid: composición, diagnóstico molecular y patogenicidad. Tesis de Doctorado PEDECIBA. UDELAR.

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: 591-597.

Alonso R. (2004). *Botryosphaeria* spp. en *Eucalyptus globulus* en Uruguay: ¿endofitismo o patogenicidad? Tesis de Maestría. PEDECIBA-UdelaR.

Alonso R, Lupo S & Bettucci L (2005). Pathogenicity evaluation of *Cytospora eucalypticola* isolated from Eucalyptus cankers in Uruguay. Fitopatologia Brasileira 30: 289-291.

Arnold AE (2007). Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21: 51–66.

Arnold AE, Mejia LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA, (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Science 100: 15649e15654.

Arnold AE & Herre EA (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological patterns and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). Mycologia 95: 388–398.

Arnold AE & Lutzoni F (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88: 541–549.

Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD & Kursar TA (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3: 267–274.

Barklund P & Kowalski T (1996). Endophytic fungi of Norway spruce with particular reference to *Tryblidopsis pinastri*. Canadian Journal of Botany 74: 673-678.

Bettucci L & Alonso R (1997). A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs of *Eucalyptus grandis* in Uruguay. Mycological Research 101: 1060-064.

Bettucci L, Alonso R & 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.

Bettucci L, Alonso R & Tiscornia S (1999a). 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.

Bettucci L, Alonso R. & Tiscornia S (1999 b). Estudio fitopatológico en plantaciones de *Eucalyptus* spp. Informe técnico. Convenio EUFORES-UdelaR.

Bettucci L & Guerrero R (1970 a). Needle cast producido por *Hypoderma desmazieri* Darker. *Boletín del Departamento Forestal* 16: 1-2.

Bettucci L. & Guerrero R, (1970 b). Banda roja de las acículas de pino. *Boletín del Departamento Forestal* 16: 3.

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

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

Brundrett MC (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds.). *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag. Berlin. Germany. pp. 281–293.

Burnett HL & Hunter BB (1998). *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society. Minnesota USA. 218 pp.

Carroll G (1988). Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2–9.

Carroll GC & Carroll FE (1978). Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* 56: 3034-3043.

Carroll G C, Müller E & Sutton BC (1977). Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia* 29: 87-103.

Clay K (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275–297.

Clay K & Holah J (1999). Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285: 1742–1745.

Clay K & Schardl CL (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160: S99–S127.

Crous PW & Gams W (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine declines and esca. *Phytopathol. Mediterr.* 39: 112-118.

Deckert RJ & Peterson RL (2000). Distribution of foliar fungal endophytes in *Pinus strobus* between and within host trees. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1436-1442.

Deckert RJ, Melville LH & Peterson RL (2001). Structural feature of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. *Mycological Research* 105: 991-997.

Domsch KH, Gams W & Anderson T (1993). *Compendium of soil fungi*. Academic Press. Verlag. 859 pp.

Ellis, M B (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England. 608 pp.

Espinosa-Garcia FJ & Langenheim JH. (1990). The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population-diversity and spatial pattern. *New Phytol.* 116: 89-97.

FAO (2006). *Manual de campo: Plagas y enfermedades de eucaliptos y pinos en el Uruguay* MGAP 167pp.

Fisher PJ, Petrini O & Sutton BC (1993). A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia* 45: 338-345.

Fröhlich J, Hyde KD & Petrini O (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104: 1202-1212.

Ganley R & Newcombe G (2006). Fungal endophyte in seeds and needles in *Pinus sylvatica*. *Mycological Research* 110: 318-327.

Guo LD, Guo RH, Wang Y, He WH, Zheng WH & Hyde KD (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research* 107: 680-688.

Hata K & Futai K (1995). Endophytic fungi associated with healthy pine needles infested by pine needle gall midge, *Thecolidopsis japonensis*. *Canadian Journal of Botany* 73: 384-390.

Hata K & Futai K (1996). Variation in fungal endophyte population in needles of genus *Pinus*. *Canadian Journal of Botany* 74: 103-114.

Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, Sarvate SD & Lutzoni F (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 543-555.

Hoff JA, Klopfenstein NB, McDonald GI, Tonn JR, Kim MS, Zambino PJ, Hessburg PF, Rogers JD, Peever TL & Carris LM (2004). Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* 34: 255-271.

Hoffman A & Arnold AE (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* 112: 331-334.

Hyde HD & Soyong K (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.

Jurc D, Jurc M, Sieber TN & Bojovic S (2000). Endophytic *Cenangium ferruginosum* (Ascomycota) as a Reservoir for an Epidemic of *Cenangium* Dieback in Austrian Pine. *Phyton; Annales Rei Botanicae* 40:103-108.

Koch de Brotos L, Boassi C, Riccio de Machado O, Gandolfo Antúnz C (1981). Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. Ministerio de Agricultura y Pesca. Informe Técnico 9. 140 pp.

Kowalski T & Kehr RD (1992). Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia* 44 :137-168.

Lee S & Taylor J (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego. California. pp. 282-287.

Lee HB, Park JY & Summerbell RC (2006). *Phaeomoniella zymoides* and *Phaeomoniella pinifoliorum* spp.nov., new acid tolerant epiphytic fungi isolated from pine needles in Korea. *Mycologia* 98: 598-611.

Leuchtman A, Petrini O, Petrini L E & Carroll GC (1992). Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycological Research* 96: 287-294.

Minter DW (1981). *Lophodermium* on pines. *Mycological Papers* 147:1–71
Minter DW, Staley JM, Millar CS (1978). Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Trans Br Mycol Soc* 71:295– 301

Minter DW & Millar CS (1980). Ecology and biology of three *Lophodermium* species on secondary needles of *Pinus sylvestris*. *Eur J Forest Pathol* 10:169–181

Minter DW & Sharma (1982). Three species of *Lophodermium* from the Himalayas. *Mycologia*, 74: 702-711.

Muller MM, Valjakka R, Suokko A, Hantula J (2001). Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Mol Ecol.* 10: 1801-1810.

Ortiz-García S, Gernandt DS, Stone JK, Johnston PR, Chapela IH, Salas-Lizana R & Alvarez-Buylla E (2003). Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia* 95: 846-856.

Petrini O (1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema NJ & van den Huevel J (eds.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK. Cambridge University Press. pp. 175–187.

Petrini, O (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J & Hirano S (eds.). *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag USA. pp.179-197.

Petrini O & Fisher PJ (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.

Ryu M, Mishra RC, Jeon J, Lee SK & Bae H (2018). Drought-induced susceptibility for *Cenangium ferruginosum* leads to progression of *Cenangium*-dieback disease in *Pinus koraiensis*. *Sci Rep* 8, 16368.

Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE & Redman RS (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314-330.

Saikkonen K (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Review* 21: 67-74.

Saikkonen K, Ion D & Gyllenberg M (2002). The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269: 1397-1403.

Saikkonen K, Wäli P, Helander M & Faeth SH (2004). Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends Plant Sci.* 9: 275-280.

Sanz-rosa A, Muller MM, San Martina R, Diez JJ (2015) Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. *Fungal Biology* 119:870-883

Sherwood M & Carroll G. (1974). Fungal succession on needles and young twigs of old-growth Douglas fir. *Mycologia* 66: 499-506.

Sieber B (2007). Endophytic fungi of forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev* 21: 75-89.

- Sieber-Canavesi F & Sieber TN (1993). Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytol* 125: 149-161.
- Sieber T N (1989). Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research* 92: 322-326.
- Sieber TN, Rys J & Hodenrieder O (1999). Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *uncinata*. *Mycological Research* 103: 306-310.
- Siebrecht S, Herdel K, Schurr U, Tischner R (2003). Nutrient translocation in the xylem of poplar diurnal variations and spatial distribution along the shoot axis. *Planta* 217: 783-793.
- Simeto S, Alonso R, Tiscornia S & Bettucci L (2005). Fungal community of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maidenii* stems in Uruguay. *Sydowia* 57: 246-258.
- Sinclair WS, Lyon HH, Johnson WT (1987). *Diseases of trees and shrubs*. 4th ed. Ithaca: Cornell University Press. p 32-33
- Slippers B & Wingfield JM (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Review* 21:90-106.
- Stanosz GR, Smith DR & Stanosz JC (1997). Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines. *Mycologia* 89: 525-530.
- Stanosz GR, Swart WJ & Smith DR (1999). RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. *Mycological Research* 103: 1193-1202.
- Stone JK, Polishook JD & White JRJ (2004). Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF & Foster MS (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington. MA. USA. Elsevier. pp. 241-270.
- Sutton BC (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. UK. 696 pp.
- Tanney JB & Seifert KA (2017). *Lophodermium resinosum* sp. nov. from red pine (*Pinus resinosa*) in Eastern Canada. *Botany* 95: 773-784.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Takeda I, Guerrero R & Bettucci L (2003). Endophytic fungi of twigs and leaves from *Ilex paraguariensis* in Brazil. *Sydowia* 55: 372-380.

Thomas SE, Crozier J, Aime MC, Evans HC & Holmes KA (2008). Molecular characterization of endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. *Mycological Research* 112: 852-860.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Vasiliauskas R, Menkis A, Finlay RD & Stenlid J (2007). Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist* 174: 441–446.

White TJ, Bruns TD, Lee SB & Taylor J W (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols and Applications. A Laboratory Manual.* Academic Press. pp. 315-322.

Wilson D (1995). Endophyte: the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276.

Wilson D & Carroll GC (1994). Infection studies of *Discula quercina* and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 86: 635-647.

Win PM, Matsumura E, Fukuda K. (2018) Diversity of tea endophytic fungi: Cultivar- and tissue preferences. *Appl Ecol Environ Res.*16(1):677-695.

Yadeta KA, Thomma BP (2014). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4(97):97

Yuan Z & Chen L (2014). The role of endophytic fungal individuals and communities in the decomposition of *Pinus massoniana* needle litter. *PLoS One* 9: 1-11.

Capítulo 2

Fusarium circinatum, un patógeno cuarentenario

INTRODUCCIÓN

El cancro resinoso del pino, es una enfermedad cuarentenaria causada por el hongo *Fusarium circinatum* (teleomorfo: *Gibberella circinata*) (Nirenberg & O'Donnell 1998). Esta enfermedad es considerada como una de las más importantes y devastadoras en coníferas (Wingfield *et al.* 2008). Afecta bosques naturales y plantaciones de diferentes especies de pino, así como también plántulas de viveros. Es una enfermedad destructiva asociada a importantes bajas en rendimientos y a altos niveles de mortalidad de árboles lo que implica importantes pérdidas económicas (Dwinell *et al.* 1985).

Prácticamente todas las especies de pino son susceptibles a esta enfermedad como también una especie de abeto *Pseudotsuga menziesii* (Dwinell 1999, Bezos *et al.* 2018). Dentro de las especies de pino, la más susceptible es *Pinus radiata*, que es la conífera más plantada en todo el mundo (Pérez *et al.* 2004).

Fusarium circinatum causa síntomas severos en árboles maduros como deformaciones en troncos y frecuente formación de canchales en tronco principal y ramas de mayor tamaño con abundante y copioso exudado de resina desde el punto de infección (Barnard & Blakeslee 1980). Estos síntomas son más comunes en *P. radiata*, *P. palustris*, *P. luchuensis*, *P. strobus* y *P. elliotii* (Correll *et al.* 1991, Dwinell *et al.* 1985, Muramoto & Dwinell 1990). En la copa los síntomas incluyen la defoliación, die-back, y enrojecimiento de las acículas. El aumento en la producción de resina se debe a la formación de canales resiníferos traumáticos como resultado de la infección fúngica. Se ha observado que el hongo obtiene nutrientes de las células que rodean los canales y del parénquima adyacente (Martin Rodriguez *et al.* 2013). El hongo puede penetrar en el xilema interrumpiendo el flujo de savia hacia las ramas que se debilitan y pueden desprenderse por acción del viento o tormentas (Hepting & Roth 1946). También puede afectar otras partes de la planta como raíces u órganos reproductivos deteriorando las semillas (Viljoen *et al.* 1994, Storer *et al.* 1997, Dwinell *et al.* 2001). Los conos en las ramas infectadas pueden abortar, si la infección ocurre antes de completar su desarrollo, no obstante, la infección en ramas también puede suceder después que los conos han madurado. Las plántulas de viveros también son afectadas por este patógeno y los

principales síntomas son amarillamiento de las acículas, marchitamiento de hojas y tallos (Barnard & Blakeslee 1980), causando damping-off pre y post emergencia.

El ciclo de la enfermedad comienza con la llegada de conidios (esporas asexuales) del hongo a las partes aéreas de la planta y penetra a través de pequeñas lesiones provocadas por factores abióticos o insectos. Posteriormente, el micelio del hongo se desarrolla, provoca canchales en ramas y tronco principal con una abundante producción y exudado de resina que corre por las ramas y tronco principal. En árboles estresados el daño puede ser total provocando la muerte. La colonización se produce en verano y principios de otoño fundamentalmente. Los insectos son los vectores más importantes del patógeno pero las esporas también pueden ser dispersadas por el viento. Los árboles afectados constituyen la fuente de inóculo del patógeno ya que en los tejidos infectados se producen esporodocios que son estructuras reproductivas donde ocurre la abundante esporulación. Los factores ambientales que contribuyen al establecimiento y severidad de esta enfermedad son temperaturas cercanas a los 25°C y alta humedad relativa. En California, se ha observado que las plantas son afectadas más severamente por el patógeno en regiones costeras que en las de tierra adentro (Gordon *et al.* 2001).

Actualmente, *F. circinatum* presenta una amplia distribución mundial y se ha reportado en 41 países (Drenkhan *et al.* 2020). Es un patógeno muy virulento e invasivo cuya propagación a nuevas áreas ha sido favorecida por la actividad antropogénica, con el transporte material de propagación de viveros y traslado de madera en el comercio internacional (Zamora-Ballesteros *et al.* 2019). El primer registro de esta enfermedad fue realizado por Hepting & Roth (1946) en el sur-este de Estados Unidos y de allí se extendió hacia el norte y zona oeste (Dwinell *et al.* 1985; Ridley & Dick 2000), donde el cancro resinoso causa epidemias generalmente asociadas a condiciones de estrés abiótico (Lopez-Zamora *et al.* 2007). En 1987 se registró por primera vez en California con importantes pérdidas en plantaciones de *Pinus radiata*, *P. muricata*, *P. pinea* y *P. halepensis* como también en poblaciones naturales de *P. radiata* (Storer *et al.* 1997). A la fecha, esta enfermedad se ha extendido y ha sido reportado en numerosos países como México, Sudáfrica, Chile, Japón, España, Portugal, Italia, entre otros (Kobayashi & Muramoto 1989, Guerra-Santos 1999, Wingfield *et al.* 2002, Perez Sierra *et al.* 2007),
Figura 2.1.

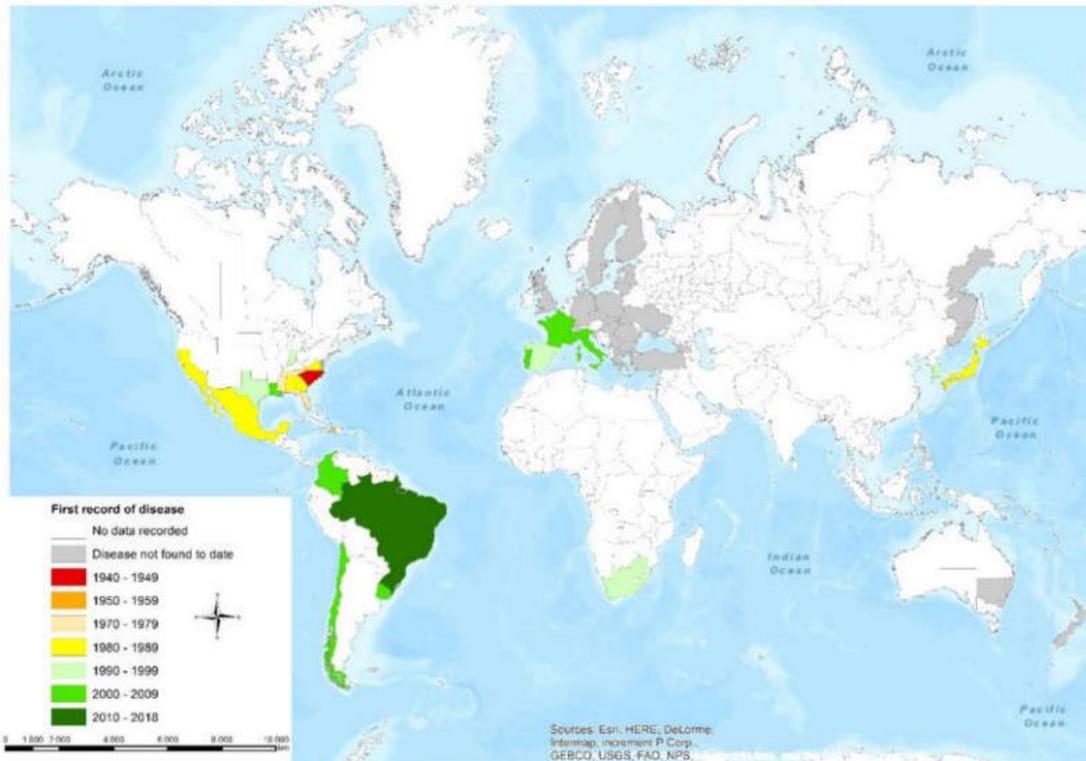


Figura 2.1. Dispersión histórica global de *Fusarium circinatum* de acuerdo a la fecha de los primeros registros en cada país. Tomado de: Drekhhan *et al.* (2020)

Se ha propuesto que el centro de origen de *F. circinatum* es México, que corresponde también al centro de origen de muchas de las especies de pino. Estudios realizados sobre la diversidad genética del patógeno en base al análisis de ocho loci polimórficos de aislados de diferentes orígenes demuestran esta hipótesis, habiéndose observado la mayor diversidad en las cepas provenientes de México (Wikler & Gordon 2000). Berbegal *et al.* 2013 estudiaron la diversidad poblacional en España utilizando microsatélites y analizaron también cepas provenientes de varios países donde se ha registrado la enfermedad. Ellos concluyeron que los aislados de Sudáfrica presentan alta similitud con los de México, sugiriendo que el patógeno fue introducido a través de semillas contaminadas de este país a Sudáfrica. En el norte de España las poblaciones de *F. circinatum* están conformadas por dos grupos divergentes y con baja diversidad genética, concordando con la hipótesis que el patógeno fue introducido en al menos dos oportunidades, probablemente desde EEUU (Berbegal *et al.* 2013).

En Uruguay, en el año 2009 se detectaron plántulas de *P. taeda* con sintomatología no registrada previamente en dos de los principales viveros que abastecían a las empresas pineras.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Fusarium circinatum* asociado a pino en Uruguay

Objetivo específico1

Identificar el o los patógenos causantes de síntomas severos presente en plántulas de vivero.

Objetivo específico2

Realizar inoculaciones experimentales de diferentes aislados obtenidos del patógeno a fin de evaluar su virulencia.

Objetivo específico3

Determinar la presencia de *F. circinatum* en plantaciones de pino de la región norte del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección e identificación de la presencia de Fusarium circinatum en viveros de pino.

Se inspeccionaron las plántulas de *Pinus taeda* obtenidas de semilla proveniente de EEUU, en dos viveros forestales, uno ubicado en el Departamento de Rivera y otro localizado en Cerro Colorado, Departamento de Florida. Se registró la presencia de numerosas plántulas con síntomas de amarillamiento de las acículas y muerte progresiva. Se tomaron muestras de plántulas enteras y se transportaron al laboratorio a fin de determinar la causalidad de dichos síntomas.

Las plántulas fueron observadas bajo lupa y en el caso de presentar lesiones a nivel de cuello se procedió a colocar en cámara húmeda los segmentos afectados. Para ello, se cortaron los segmentos de los órganos, se enjuagaron para quitar restos del sustrato y se colocaron en una placa de Petri conteniendo papel de filtro estéril embebido en agua destilada estéril, el material vegetal se colocó sobre un portaobjetos para evitar el contacto directo con el papel. Una vez que se desarrollaba micelio esporulado se procedió al aislamiento en medio agar-papa-dextrosa (PDA) y se realizaron preparados para la observación al microscopio y realizar la primera aproximación a la identificación por micromorfología, observando tipo y tamaño de conidios, tipo y forma de células conidiógenas y presencia o ausencia de clamidosporas u otros elementos del micelio.

Por otra parte, se analizaron tejidos de raíz y tallo en la zona del cuello de las plántulas. Se lavaron las plántulas bajo agua corriente para quitar restos del sustrato, luego se cortaron segmentos de 3 mm que fueron desinfectados superficialmente con etanol 80%, seguido de hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Los segmentos de los tejidos se sembraron en placas de Petri conteniendo PDA a pH4.

Los hongos emergentes con características morfológicas del género *Fusarium*, se aislaron en cultivo puro y fueron identificados de acuerdo a la micromorfología por los métodos micológicos habituales. Para la verificación de la identificación de *Fusarium circinatum* se tomaron en cuenta las características micromorfológicas de las cepas realizando cultivos monosporicos sobre los medios de cultivo PDA (Agar-papa-dextrosa) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer- Agar) de acuerdo con Leslie & Summerell (2006). Los caracteres considerados fueron, presencia y forma de macro y microconidios, tipo de célula conidiógena (monofiálides o polifiálides), presencia o ausencia de clamidosporas y presencia de hifas enroscadas. Para la verificación de la identificación por métodos moleculares se realizó la extracción de ADN por el método CTAB seguido de una extracción orgánica y precipitación en isopropanol siguiendo el método descrito por Lee & Taylor (1990). La región del espaciador intergénico (IGS) fue amplificada por PCR utilizando los cebadores especie-específicos CIRC1A (TCG ATG TGT CGT CTC TGG AC) y CIRC4A (CGA TCC TCA AAT CGA CCA AGA) (Schweigkofler *et al.* 2004). Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (2%), teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizados bajo luz ultravioleta. De los productos de PCR, uno fue secuenciado en MACROGEN, Corea y se realizó una búsqueda mediante el Blast de la secuencia obtenida con las reportadas en el GenBank.

Inoculación experimental de aislados de Fusarium circinatum

Para la evaluación de la virulencia de aislados de *F. circinatum* sobre plantines de *Pinus taeda* se seleccionaron 5 aislados de *F. circinatum* obtenidos de plántulas sintomáticas, las cepas FC 00, FC 5, FC 2053, FC 2054 y FC 2057. El inóculo se preparó a partir de cultivos en placas de Petri conteniendo PDA, se incubaron en estufa a 25°C por 7 días. Los plantines de 8 meses de *Pinus taeda* para el ensayo fueron cedidas por el vivero Buena Unión.

Para la inoculación del patógeno, se realizó una herida superficial de aproximadamente 5 mm con un bisturí estéril en la porción basal del tallo de las plantas donde se retiró la

corteza superficial. Luego se colocó un disco de 5 mm de diámetro conteniendo el inóculo del patógeno, dicho disco se obtuvo del margen de la colonia del hongo en activo crecimiento, luego se selló con Parafilm para evitar la desecación. Se inocularon 10 plantas por cepa, como testigo se utilizaron 10 plantas en las que se realizó la herida y se inoculó un disco de PDA estéril sin hongo. El experimento se realizó en un invernáculo de la EEMAC, Facultad de Agronomía en Paysandú. Luego de un mes las plantas fueron colocadas a la intemperie, manteniendo riego para su normal desarrollo por 3 meses.



Figura 2.2 Plantas inoculadas con diferentes cepas de *F. circinatum*.

Luego de 3 meses de inoculadas se observó el estado general de las plantas y se determinó el aspecto general del follaje, presencia de cancro en la zona de inoculación y se estableció una escala visual de 1-5, donde 1 es planta verde sin síntomas, 2 planta con acículas amarillentas o exudado de resina, pero con normal desarrollo, 3 planta con la mitad de las acículas secas, 4 plántulas muertas, 5 plántulas muertas con canchros y exudado de resina. Las plántulas con síntomas fueron analizadas en el laboratorio para la recuperación del patógeno. Para ello se sembraron segmentos de los tejidos en la zona cercana a la inoculación sobre medio de cultivo PDA.

Presencia de cancro resinoso en plantaciones adultas

Desde el 2010 al 2018, se realizaron numerosas observaciones en plantaciones de pino localizadas en los Departamentos de Rivera, Tacuarembó y Cerro Largo donde se

inspeccionaron visualmente árboles que presentaban algún tipo de síntoma en su follaje similar al producido por *F. circinatum* o la presencia de canchales en troncos o ramas con abundante exudado de resina. En caso de detectar síntomas semejantes al producido por el patógeno, se tomaron muestras para analizar en el laboratorio. Durante ese período las empresas productoras de pino, en sus monitoreos habituales, tomaron muestras de árboles que presentaban sintomatología y las enviaron al Laboratorio de Micología para ser analizadas. Por otra parte, la dirección de Servicios Agrícolas de MGAP en conjunto con la Dirección Forestal (MGAP) realizaron un plan de monitoreo para esta enfermedad en las plantaciones.

Se analizaron micológicamente numerosas muestras de ramas y fustes con lesiones y abundante exudado de resina como así también de ramitas con acículas. Estas muestras fueron observadas bajo lupa y los tejidos afectados se colocaron en cámara húmeda para estimular la esporulación. Por otra parte, se sembraron segmentos de tejidos afectados en medio de cultivo (siguiendo la misma metodología utilizada en plántulas de vivero) para el aislamiento de hongos asociados.

RESULTADOS

La sintomatología presente en plántulas provenientes de dos viveros, se caracterizó por diferentes grados de clorosis de las acículas desde decoloración amarillenta a una coloración roja que termina con el secado de las acículas. A nivel del tallo, fundamentalmente en la zona del cuello se observaron frecuentemente rajaduras de la corteza. De la observación de estas rajaduras colocadas en cámara húmeda se pudo constatar, en muchas de ellas, la presencia de esporodocios conteniendo masas de macroconidios de *Fusarium* (Figura 2.3). De los segmentos de raíces y tallo de las plántulas sembrados sobre PDA, se obtuvieron también numerosas cepas de varias especies de *Fusarium*. Entre ellas, las principales en raíces fueron, *F. solani*, *F. nygamai* y *F. oxysporum* mientras que en la zona del cuello del tallo predomina *F. nygamai* y *F. circinatum*. Esta última especie se identificó por las características morfológicas y moleculares.

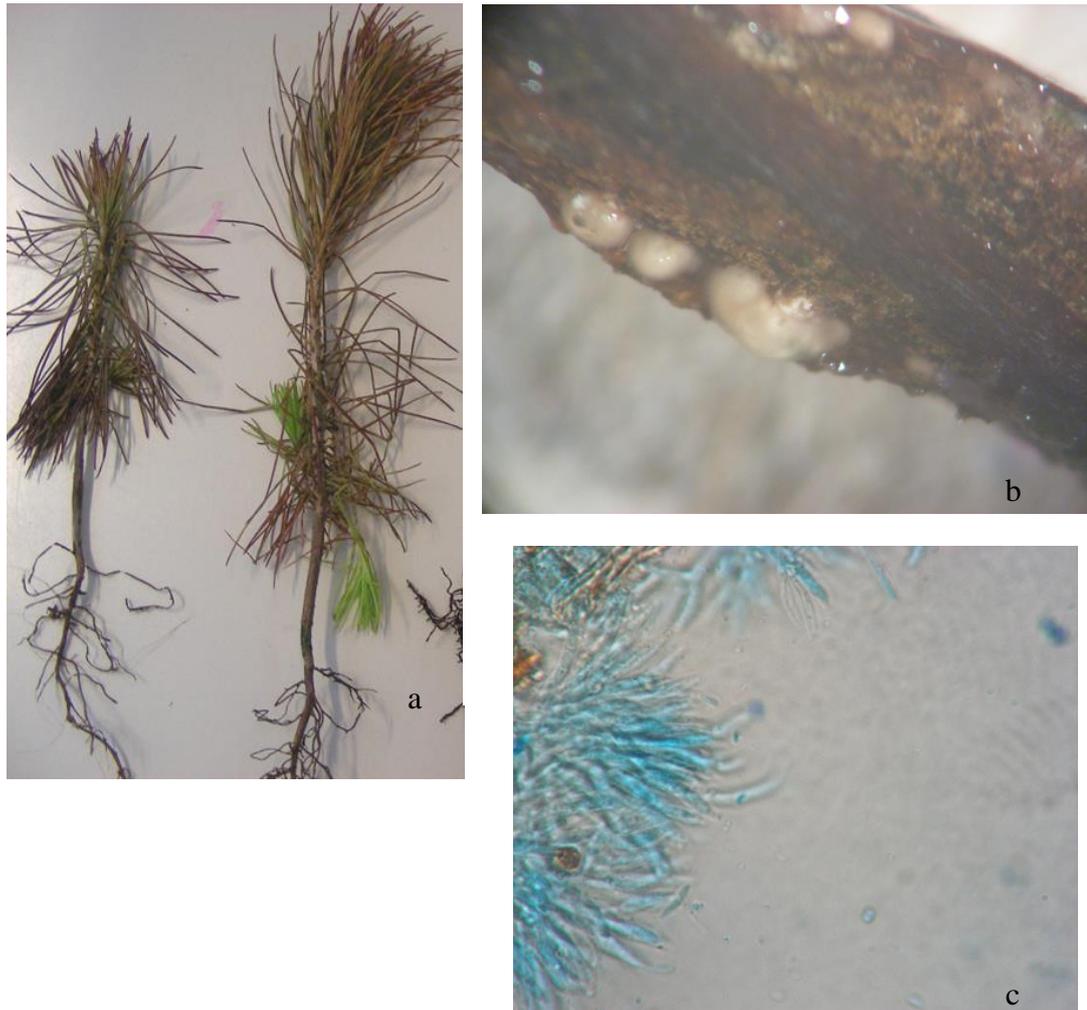


Figura 2.3. a: Aspecto de plántulas afectadas por *F. circinatum*, b: lesión de corteza y presencia de esporodoquios bajo lupa 40x, c: esporodoquios con macroconidios

Colonias en PDA

Micelio aéreo algodonoso blanco, en algunos aislados se observa una leve coloración rosa o violácea. El reverso presenta una pigmentación violeta que difunde desde la zona central colonia sobre el medio de cultivo PDA (Figura 2.4).

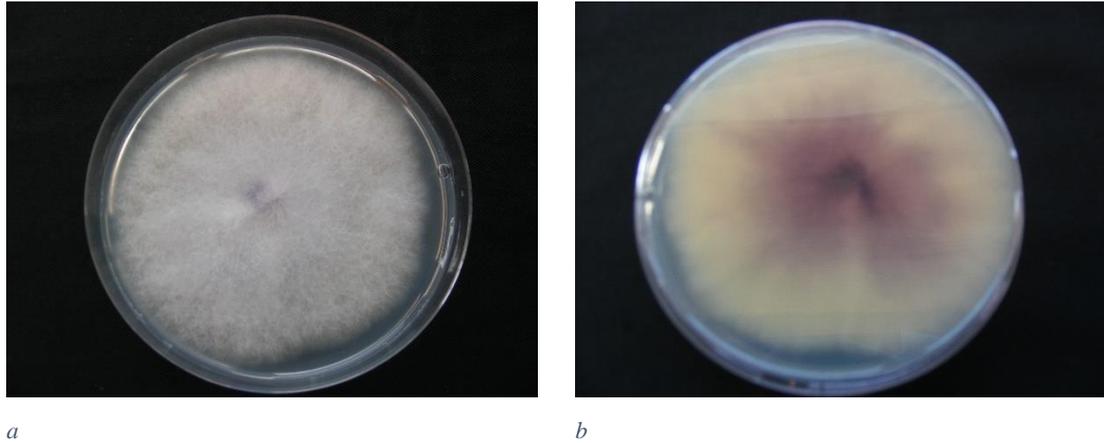


Figura 2.4. Características de la colonia de *F. circinatum* en PDA, a:anverso, b:reverso

Características micromorfológicas en SNA

En los preparados para la observación microscópica obtenidos de los cultivos sobre SNA se pudo observar la presencia de hifas estériles enrolladas características de esta especie (Figura 2.5a). Los conidióforos están constituidos principalmente por polifiálides (Figura 2.5 b), aunque puede presentar algunas monofiálides. La producción de macro y microconidios fue abundante y no se observaron clamidosporas en el micelio. Los macroconidios son multicelulares, usualmente con 3 septos, delgados cilíndricos con los extremos curvos. Los microconidios presentan forma ovoide y son unicelulares.

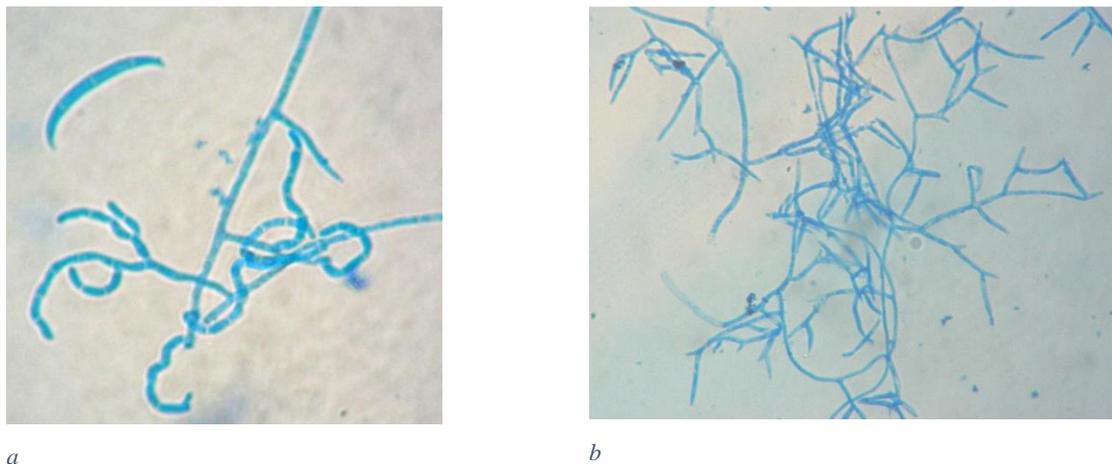


Figura 2.5 Características microscópicas de *F. circinatum*. a: Hifas estériles enrolladas y macroconidio, b: polifialides.

Identificación molecular

Los amplicones obtenidos son de 360 pares de bases, lo que concuerda con lo establecido para *F. circinatum*. Se utilizó una cepa de otra especie, *Fusarium nygamai*, como control y este no produjo dicho amplicón como tampoco el control negativo correspondiente al mix de PCR sin ADN (Figura 2.6).

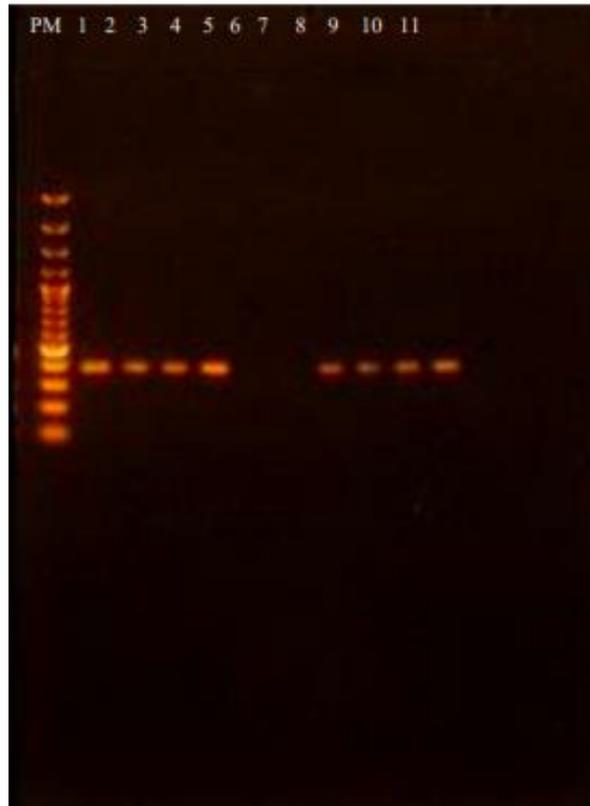


Figura 2.6. Electroforesis en gel de agarosa, los amplicones de 360 pb de la región IGS de *F. circinatum* correspondiente a 3 cepas. Carriles: PM: Marcador de peso molecular, 1y2: cepa FC32, 3y4: cepa FC45, 5y6: cepa *F. nygamai*, 7y8 control positivo, 9y10 FC2057, 11: control negativo.

La secuencia obtenida mostró un 99% de similitud con las registradas para *F. circinatum* en el GenBank.

Se pudo determinar que los aislados obtenidos en cultivo pertenecen a *Fusarium circinatum* de acuerdo con las características micromorfológicas y moleculares.

Inoculación experimental

Se observó variación en la virulencia de los diferentes aislados inoculados. A su vez hubo diferencias entre las repeticiones dentro de cada aislado inoculado en las 10 plantas (Tabla 2.1). Algunas plantas fueron dadas de baja ya que hubo ataque de hormigas.

Tabla 2.1 Resultados de la inoculación experimental sobre plantines de *P. taeda*. Los valores 1-5 indican estado sanitario de la planta luego de 3 meses de realizada la inoculación. (-) indica repetición dada de baja.

repetición	FC5	FC2057	FC2053	FC2054	FC00	Testigo
1	5	5	1	2	1	1
2	-	5	2	1	1	1
3	-	5	3	3	1	1
4	1	3	4	4	1	1
5	4	4	2	2	2	-
6	4	2	4	2	-	1
7	5	5	4	2	-	1
8	2	5	2	1	1	1
9	2	2	5	1	1	1
10	5	-	-	-	1	1

Se observaron diferencias en la actividad de los aislados, el más agresivo fue FC2057, que produjo la muerte de 6 plantas y en las restantes, se veían signos de enfermedad (Figura 2.7). En los segmentos analizados de los tejidos cercanos al punto de inoculación en el laboratorio, se pudo recuperar el patógeno. El aislado FC5 mostró un comportamiento similar al anterior. En las plantas inoculadas con FC 2053, la mitad mostraron síntomas muriendo al final del experimento, mientras que dos plantas permanecieron saludables y otras fueron dadas de baja. El aislado FC 2054 mostró menor virulencia mientras que FC00 no resultó virulento, las plantas permanecieron saludables sin diferencia con las plantas testigo. En todos los casos las plantas testigo permanecieron saludables, sin síntomas.



Figura 2.7. a: Planta inoculada con FC2057 y testigo, b.: planta inoculada con FC00 y testigo.

Presencia de cancro resinoso en arboles de plantaciones adultas

Durante el período de estudio no se detectó la presencia de *F. circinatum* en plantaciones. En los monitoreos realizados por la dirección de Servicios Agrícolas y la Dirección Forestal no se encontraron arboles con signos de esta enfermedad en las plantaciones. Por otra parte, de los numerosas muestras analizadas en el laboratorio provenientes de las empresas pineras, no se pudo detectar la presencia del patógeno. Solo se aislaron especies de hongos saprófitos colonizando los tejidos necróticos y zonas con abundante exudado de resina. La mayor parte de las muestras analizadas provenían de árboles expuestos a diferentes condiciones de estrés abiótico, como sequía o suelos no aptos para el buen desarrollo de los árboles.

DISCUSION

La detección y confirmación de *F. circinatum* afectando plántulas de vivero constituyó un importante aporte para el control de la sanidad de las plantaciones de pino locales, ya que se trata de una especie cuarentenaria que no estaba presente en el país. Probablemente, el inóculo del patógeno ingresó con las semillas provenientes de EEUU. Esto concuerda con lo encontrado por Berbegal *et al.* (2013) en su análisis de la estructura genética de aislados provenientes de diferentes países, donde incluyeron 4 aislados obtenidos en este estudio. Encontraron que los aislados de Uruguay, presentaban alta

similitud con aquellos de EEUU, como también ocurrió con los de Japón y España. Sin embargo, los aislados de Sudáfrica presentaron alta similitud con poblaciones de México, lo que concuerda con la hipótesis de que el ingreso de este patógeno se ha producido también por material de propagación, proveniente de México. *F. circinatum* fue registrado por primera vez en Sudáfrica en 1990 provocando enfermedad en raíz de plántulas de *P. patula* (Viljoen *et al.* 1994). Luego se extendió a la mayor parte de viveros, donde representa el patógeno más importante de *Pinus* spp. (Britz *et al.* 2005). Sin embargo, el problema ha quedado restringido a los viveros, solo detectándose en plantaciones de *P. radiata* en la región de la Península del Cabo (Coutinho *et al.* 2007). En Chile, *F. circinatum* fue registrado en 2002 en viveros de plántulas y clones de *P. radiata* (Wingfield *et al.* 2002). Si bien se han detectado, en casos aislados, árboles adultos afectados por el patógeno en plantaciones, probablemente estos sean provenientes de plantines asintomáticos infectados de vivero, no existiendo evidencia de que el patógeno se haya expandido en las plantaciones, donde se realiza un estricto seguimiento ya que la especie más plantada es *P. radiata* que como ya se mencionó es la más susceptible a este patógeno (Beeche *et al.* 2005, Wingfield *et al.* 2008)

En Uruguay, la rápida detección, permitió tomar medidas para mitigar el posible impacto de esta enfermedad en plantaciones de campo. En este caso, todas las plántulas afectadas se quemaron, se eliminó el sustrato utilizado en el vivero, se realizó una desinfección total de las áreas y se procedió a eliminar la partida de semillas como medida preventiva.

La diversidad de otras especies de *Fusarium* presentes en las plántulas fue alta, sin embargo, este hecho no es llamativo, ya que la mayoría de las especies han sido frecuentemente encontradas asociadas a otros cultivos en Uruguay. En nuestro país, las especies de *Fusarium* tienen alta incidencia en el desarrollo de distintas enfermedades, probablemente debido a las características climáticas que favorecen el desarrollo de estos patógenos. *Fusarium oxysporum* es una especie común en suelo que puede ser saprófita como también patógena de semillas y raíces de una variedad de hospederos que incluyen algunas especies de Pino (Martin- Pinto *et al.* 2008).

Davydenko *et al.* (2018) encontraron que varias especies de *Fusarium* afectan también la viabilidad de semillas y plantines de *Pinus sylvestris* causando damping off, resultando en pérdidas importantes principalmente cuando las plántulas crecen en recipientes con turba debido a la naturaleza ácida del sustrato.

El ensayo de inoculación artificial de plantines, si bien fue una evaluación preliminar, permitió evidenciar que *F. circinatum* es patógeno para los plantines de *P. taeda* en

condiciones locales, y que existe variabilidad tanto en la agresividad de los aislados utilizados como en las respuestas de los plantines, que en este caso provenían de semilla. Hubo un solo aislado (FC00) que no produjo ningún síntoma, resultando avirulento, y el aislado FC2057 fue el más agresivo que produjo síntomas y secado en todas las plantas inoculadas. Esta variación en el comportamiento de los diferentes aislados podría reflejar diferencias genéticas en la población del patógeno. Esto coincide con los resultados del estudio de genética poblacional donde se observaron diferencias en las cuatro cepas analizadas de Uruguay, habiendo dos genotipos diferentes (Berbegal *et al.* 2013).

Por otra parte, en la interacción de *F. circinatum* y *P. pinaster* se ha descubierto que el patógeno es capaz de sintetizar fitohormonas normalmente producidas por la planta en respuesta a las infecciones, de modo que el patógeno produce una perturbación en la homeostasis del árbol que favorecería la colonización del patógeno (Hernandez-Escribano *et al.* 2020)

Si bien a la fecha, no se ha registrado la presencia del cancro resinoso en plantaciones afectando árboles adultos, es importante mantener un monitoreo a fin de detectar tempranamente su presencia en el campo. En este sentido, los resultados de las prospecciones realizadas en este trabajo han sido concordantes con los resultados de la vigilancia específica para *F. circinatum* realizadas por el MGAP en el período 2013-2015 (Escudero, P, MGAP, comunicación personal).

Si bien *Pinus taeda* no es de las especies más afectadas por este patógeno en su área de distribución natural, su susceptibilidad en plantaciones fuera de su área de distribución natural no ha sido muy estudiada. La ausencia de esta enfermedad en plantaciones locales, probablemente se deba a que la detección del patógeno se realizó tempranamente a nivel de vivero y esto evitó la instalación de plantas infectadas en el campo.

Por otra parte, si bien las condiciones climáticas del país son favorables para el desarrollo del patógeno (Ganley *et al.* 2009) y es frecuente que en plantaciones de pino existan numerosos insectos que hubieran podido actuar como vectores del mismo, es evidente la ausencia de inóculo (esporas) en las plantaciones ya establecidas. En países donde el cancro resinoso constituye un problema serio, como es el norte de España, en zonas donde hay gran incidencia del cancro resinoso afectando *P. radiata*, se han observado diferencias en la distribución del mismo, siendo favorecido en las zonas cercanas a la costa (Blank *et al.* 2019). En California, también tiene mayor impacto fundamentalmente en áreas costeras, con climas cálidos. Además, Sakamoto & Gordon (2006) encontraron un efecto significativo de la humedad en la frecuencia de infección en heridas provocadas

por insectos. Wikler *et al.* (2003) encontraron que plantaciones cerca de la costa presentaban niveles más altos de esta enfermedad comparado con plantaciones interiores más alejadas de la costa. En Chile el cancro resinoso no ha ocurrido en plantaciones comerciales, especialmente aquellas establecidas en la inmediata vecindad de los viveros donde el patógeno está presente. Probablemente, las características climáticas de bajas temperaturas y baja humedad relativa no son favorables para su desarrollo (Carrasco *et al.* 2016).

En Uruguay, un problema sanitario importante que ha surgido y extendido rápidamente en las plantaciones de pino en los últimos años, lo constituyen los escarabajos de la corteza (Gómez 2014). Estos insectos podrían constituir importantes agentes de dispersión de la enfermedad si esta llegara a las plantaciones como ha ocurrido en el norte de España (Bezos *et al.* 2015, Bezos *et al.* 2018), siendo el monitoreo constante de este patógeno fundamental para preservar las plantaciones de pino libres de esta enfermedad.

En el anexo 1, se adjunta el artículo publicado proveniente parcialmente de resultados expuestos en este capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

Barnard EL & Blakeslee GM (1980). Pitch canker of slash pine seedlings: a new disease in forest tree nurseries. *Plant Disease* 64: 695-696.

Beéche M, González P, Sandoval S & Murillo ME (2005). Informativo fitosanitario forestal. *Servicio Agrícola y Ganadero* 1: 1-5.

Berbegal M, Pérez-Sierra, Armengol J & Grünwald NJ (2013). Evidence for multiple introductions and clonality in Spanish populations of *Fusarium circinatum* *Phytopathology* 103: 851-861.

Bezós D, Martínez-Álvarez P, Díez JJ & Fernández MM (2015). The pine shoot beetle *Tomicus piniperda* as plausible vector of *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Ann. For. Sci.*, 72: 1079-1088.

Bezós D; Martínez-Álvarez P, Sanz-Ros A, Martín-García J, Fernández M & Díez, J (2018). Fungal Communities Associated with Bark Beetles in *Pinus radiata* Plantations in Northern Spain Affected by Pine Pitch Canker, with Special Focus on *Fusarium* Species. *Forests* 9: 698.

Blank L, Krasnov H, Martín-García J, Blank J, Martín-García J, Bezós D, Vettraino AM, Krasnov H, Lomba JM, Fernández M & Díez J (2019). Factors affecting the distribution of pine pitch canker in Northern Spain. *Forests* 10 (4).

Britz H, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO, Wingfield MJ (2005). Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella circinatum* in South Africa. *Plant Pathology* 54: 46-52. doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01108.x

Carrasco A, Sanfuentes E, Durán Á & Valenzuela S (2016). Cancro resinoso del pino: ¿una amenaza potencial para las plantaciones de *Pinus radiata* en Chile? *Gayana Bot.* 73: 369-380.

Correll JC, Gordon TR, McCain AH, Fox JW, Koehler CS, Wood DL, Schultz ME (1991) Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution, and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Disease* 75, 676--682.

Coutinho TA, Steenkamp ET, Mongwaketsi K, Wilmot M & Wingfield MJ (2007). First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology* 36: 256-261.

Davydenko K, Nowakowska JA, Kaluski T (2018). A comparative study of the pathogenicity of *Fusarium circinatum* and other *Fusarium* species in Polish Provenances of *P. sylvestris* L. *Forests* 9 :1-13.

- Dwinell LD, Barrows-Broadus J & Kuhlman EG (1985). Pitch canker: a disease complex of southern pines. *Plant Disease* 69: 270-276.
- Dwinell LD (1999). Global distribution of the pitch canker fungus. In: *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. En: Devey ME, Matheson AC & Gordon TR (eds.). pp. 54-57. CSIRO. Australia.
- Dwinell LD, Fraedrich SW & Adams D (2001). Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. In: Summerell BA, Leslie J, Backhouse D, Bryden WL & Burgess LW (eds.). *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. The American Phytopathological Society. St Paul. MN). pp. 225-232.
- Hernandez-Escribano L, Visser EA, Iturrutxa E, Raposo R & Naidoo S (2020). The transcriptome of *Pinus pinaster* under *Fusarium circinatum* challenge. *BMC Genomics* 21 (28).
- Ganley RJ, Watt MS, Manning L, Iturrutxa E (2009). A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Can J For Res.* 39: 2246-2256.
- Guerra-Santos JJ (1999). Pitch canker on Monterey pine in Mexico. In: Devey TR, Matheson ME & Gordon AC (eds.). *Current and potential impacts of pitch canker in radiata pine*. Proceedings of the IMPACT Monterey Workshop, Monterey, California. USA. 30 November-3 December 112: 58-61.
- Gómez D (2014). *Diversidad y Estacionalidad de Escarabajos de Corteza (Coleoptera: Scolytinae) en Pinus taeda L. en Uruguay*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Opción Zoología. PEDECIBA. UDELAR.
- Gordon TR, Storer AJ & Wood DL (2001). The pitch canker epidemic in California. *Plant Dis.* 85: 1128-1139.
- Hepting GH & Roth ER (1946). Pitch canker, a new disease of some southern pines. *J. For.* 44: 742-744.
- Lee S & Taylor J (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego. CA. pp .282-287.
- Leslie JF & Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Manhattan NY. pp.1-388.
- Lopez-Zamora I, Bliss C, Jokela EJ, Comerford NB, Grunwald S, Barnard E & Vasquez GM (2007). Spatial relationships between nitrogen status and pitch canker

disease in slash pine planted adjacent to a poultry operation. *Environ Pollut.* 147: 101-111.

Martín-Pinto P, Pajares J & Díez J (2008). Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* Seedlings in Northwest Spain. *For. Pathol.* 38: 78-82.

Martín-Rodrigues N, Espinel S, Sanchez-Zabala J, Ortíz A, González-Murua C & Duñabeitia MK (2013). Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophore development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytol.* 198: 1215-1227.

Muramoto H, Dwinell LD (1990) Pitch canker of *Pinus luchuensis* in Japan. *Plant Disease* 74, 530.

Pérez JRR, Taboada MFA, Cisneros JR, Rodríguez J & Álvarez EM (2004). Seguimiento y gestión de las masas de *Pinus radiata* Don. en la comarca de El Bierzo (León). *Cuadernos de La Sociedad Española de Ciencias Forestales* 253: 249-253.

Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegá M, García-Jiménez J, & Armengol J (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* 111: 832-839.

Ridley GS & Dick MA (2000). Pine pitch canker disease: the casual fungus and its distribution. *Australasian Plant Pathology* 29: 263-266.

Sakamoto JM & Gordon TR (2006). Factors influencing infection of mechanical wounds by *Fusarium circinatum* on Monterey pines (*Pinus radiata*). *Plant Pathol.* 55: 130-136.

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

Storer AJ, Gordon TR, Wood DL & Bonello P (1997). Pitch canker disease of Pines. *Current and Future Impacts.* *J For* 95:21–26.

Viljoen A, Wingfield MJ & Marasas WFO (1994). First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on seedlings in South Africa. *Plant Disease* 78: 309-312.

Wikler K & Gordon TR (2000). An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. *Canadian Journal of Botany* 78: 709-717.

Wikler K, Storer AJ, Newman W, Gordon TR & Wood DL (2003). The dynamics of an introduced pathogen in a native Monterey pine (*Pinus radiata*) forest. *For. Ecol. Manag.* 179: 209-221.

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

Zamora-Ballesteros C, Díez JJ, Martín-García J, Witzell J, Solla A, Ahumada R, Capretti P, Cleary M, Drenkhan R, Dvořák M (2019). Pine Pitch Canker (PPC): Pathways of Pathogen Spread and Preventive Measures. *Forests* 10: 1158.

Capítulo 3

Hongos manchadores de madera asociados a escarabajos de la corteza

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones de pino a diferencia de las de *Eucalyptus* tienen como principal destino la producción de madera aserrada. En la producción de madera aserrada es importante la obtención de trozas de buena calidad para abastecer la industria y obtener productos viables de exportación.

A partir de los años 2008-2009, uno de los principales problemas sanitarios que han sufrido las plantaciones de pino es la presencia y expansión de especies introducidas de escarabajos de la corteza (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) (Gómez & Martínez 2013). Estos insectos, originarios de Europa y Asia, ocasionan disturbios en los bosques naturales de coníferas y tienen gran impacto en la calidad de la madera e incluso muchos de ellos causan importantes tasas de mortalidad de los árboles, ubicándolos dentro de los insectos forestales más dañinos. En el Hemisferio Sur, se han instalado en los países donde se explotan comercialmente las plantaciones de pináceas exóticas: Nueva Zelanda, Australia, Sudáfrica, Chile, Brasil y Argentina (Lantschner *et al.* 2017). La introducción de estos escarabajos se puede producir a través del ingreso de madera bruta sin tratar, en especial si contiene la corteza y en embalajes de madera de diversos productos que son transportados desde otros países (Meurisse *et al.* 2019).

En Uruguay, en 2008, por primera vez desde la introducción del pino para la forestación comercial, hace más de 60 años, se registraron focos de infección de escolítidos, detectándose varios árboles muertos en diferentes puntos del país (Figura 3.1). En 2009 se registró una importante expansión que alcanzó niveles epidémicos oficialmente reportados al Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (Gómez *et al.* 2012, Gómez & Martínez 2013). Esta situación llevó a que el Comité Ejecutivo de Coordinación en materia de Plagas y Enfermedades, estableciese un sistema de monitoreo de escolítidos para identificar las especies de escarabajos presentes y establecer un sistema de trampeo (Gómez 2014).

Los escarabajos de la corteza son insectos de pequeño tamaño que se alimentan del floema fresco y del cambium. Presentan varias generaciones al año y suelen actuar de forma

coordinada a través de feromonas, construyen galerías en la porción interna de la corteza para su reproducción constituyendo plagas de gran importancia económica forestal. Existen aproximadamente 4100 especies descritas (Wood & Bright 1992). La mayoría de las especies son inofensivas en árboles vivos saludables, infectando principalmente árboles estresados, debilitados o muertos en su ambiente nativo. Sin embargo, en plantaciones uniformes pueden tener brotes epidémicos, atacando agresivamente y provocando la muerte de árboles saludables (Raffa *et al.* 2015). Cuando las condiciones son apropiadas para la infestación y el ataque es realizado por un gran número de individuos, las defensas del árbol hospedero no son suficientes. Las galerías y cámaras pupales de los escarabajos pueden provocar el anillamiento, cortando el flujo de nutrientes y provocando la muerte del árbol (Figura 3.1). En algunos casos, los adultos pueden alimentarse de plantines recién establecidas provocando daño a nivel del cuello y raíces lo que conduce a la muerte de la planta por anillamiento y posterior interrupción en el flujo de savia, además de facilitar la entrada de patógenos (Parra 1996).



Figura 3.1 Plantación de *Pinus taeda* en el Departamento de Rivera. Se observan focos de ataque por escolítidos

Los escarabajos de la corteza tienen una amplia distribución geográfica y de hospedantes, siendo ampliamente estudiados, sobre todo en el hemisferio norte (Lekander *et al.* 1977). Probablemente, en sus lugares de origen las especies de escarabajos tienen especificidad por determinado género de árbol (Sauvard 2004, Bertheau *et al.* 2009). Sin embargo, han mostrado la capacidad de adaptación a nuevos hospedantes cuando son introducidos en nuevos ambientes (Marchant & Borden 1976, Yan *et al.* 2005).

Las especies presentes en Uruguay son *Hylurgus ligniperda* (F.), única especie registrada antes de 2008 sobre una especie no determinada de *Pinus* (Ruffinelli 1967; Wood & Bright 1992). La segunda especie registrada en la epidemia fue *Cyrtogenius luteus*

(Blandford), en plantaciones de *P. taeda*, *P. pinaster* y *P. elliotii* debido a una introducción de Asia (Gómez & Martínez 2012) y posteriormente *Ortotomicus erosus* en *P. taeda*, *P. pinaster* y *P. elliotii* (Gomez & Martínez 2013) (Figura. 3.2).



Figura 3.2. *Hylurgus lygniperda*, *Cyrtogenius luteus*, *Ortotomicus erosus* (foto Demián Gómez)

Además del daño directo que ocasionan, otra característica interesante de los escarabajos de la corteza es su estrecha asociación con hongos Ophiostomatales (Ascomycota) causantes de decoloración de la madera y algunas especies, además, son patógenas importantes (Wingfield *et al.* 1993, Kiristis 2007). Los escarabajos son los vectores de estos hongos, transportan las esporas en la superficie de su cuerpo o en micangios, estructuras especializadas para el transporte de esporas (Happ Happ & French 1976, Six *et al.* 2003, Harrington 2005, Kirisits 2007). Un número considerable de especies de hongos asociados a los escarabajos de la corteza son importantes patógenos forestales que provocan marchitamiento vascular, como la enfermedad del olmo, provocada por *Ophiostoma ulmi* y *Ophiostoma novo-ulmi* que ha causado la muerte de millones de árboles de olmo en Europa y Norteamérica (Brasier 1991). En este caso, los escarabajos *Scolytus multistriatus* y *Hylurgopinus rufipes* se alimentan de ramas en la copa de los árboles y esto conduce a una transmisión eficiente de los patógenos de los árboles enfermos a los sanos (Webber & Brasier 1984).

La decoloración de la albura de coníferas provocada por muchas especies de hongos Ophiostomatales asociadas a escolítidos causa grandes pérdidas en la industria de la madera (Whitney 1982, Seifert 1993). Las esporas de estos hongos germinan y el micelio coloniza la madera, que avanza obteniendo nutrientes de las células parenquimáticas radiales y axiales, provocando la decoloración de la albura, fenómeno llamado mancha de la albura o mancha azul (Figura 3.3). En general las especies de hongos de la mancha azul provocan esta decoloración solo superficialmente ya que no tienen la capacidad de

colonizar el duramen de la madera debido a las condiciones restrictivas del contenido de humedad que este posee (Encinas & Daniel 1995).

La mancha azul se caracteriza por ser una decoloración de la madera provocada por el crecimiento de las hifas fúngicas pigmentadas con melanina, que avanzan por la albura en árboles vivos susceptibles y sobre madera cortada y recientemente apeada. Constituye una alteración de las propiedades ópticas de la madera, provocando una coloración azul, grisácea o negra debido a que las hifas se concentran fundamentalmente en los radios parenquimáticos, en los canales resiníferos o en el interior de las traqueidas (Seifert 1993). Si bien el micelio de estos hongos no tiene la capacidad de atravesar las paredes de las células xilemáticas, son capaces, en estados avanzados de la colonización, de penetrar en las traqueidas a través de las perforaciones de su pared (Ballard *et al.* 1982). Dado que los hongos manchadores requieren condiciones aeróbicas para su crecimiento, en general, colonizan madera que ha sufrido daño o árboles recién cortados, como también madera procedente de raleos, que, al contener gran proporción de albura y madera juvenil, favorecen el desarrollo de los mismos (Zeff 1999). El efecto que produce la mancha azul sobre la madera es fundamentalmente estético ya que no hay alteración evidente de las propiedades físicas (Seifert 1993), a excepción de la higroscopicidad y la permeabilidad, cuando el ataque es muy severo (Byrne *et al.* 2005).

Aunque los hongos productores de mancha no suelen afectar las propiedades mecánicas, se ha observado que la albura madura de *Pinus silvestris* muy atacada puede perder de un 16 a 25% de su resistencia mecánica a esfuerzos estáticos (Rodríguez & Arriaga 1988) y un 30% de su resistencia mecánica al impacto (Byrne *et al.* 2005).

Por lo tanto, se trata de un daño post-cosecha que reduce significativamente el valor comercial de la madera (Harrington, 1998, Jacobs & Wingfield 2001), llegando a ser rechazada para su procesamiento si el alcance del machado es significativo.



Figura 3.3. Decoloración de la albura (mancha azul) en troza de *P. taeda*.

La especificidad de los hongos manchadores con sus vectores es variable. Existen especies que solo se las encuentra asociadas a una o pocas especies de escarabajos, mientras otras tienen un amplio rango de vectores (Six *et al.* 2003, Krisits 2004, Harrington 2005). En particular, los escarabajos que tienen micangios tienen más especificidad por los hongos que transportan, como *Dendroctonus ponderosae* que tiene relación con *Ophiostoma clavigerum* (Six & Paine 1998).

Pero la relación entre los hongos y los escarabajos está poco esclarecida, algunos autores sostienen que estos hongos contribuyen a debilitar los mecanismos de defensa naturales del árbol contra el ataque de insectos, mientras que otros sostienen que solo son contaminantes incidentales (Kiristis 2007). Más aún, algunos ácaros transportados por los escolítidos poseen una estrecha simbiosis con los hongos Ophiostomatales. Estos ácaros se alimentan de los hongos y también actúan como vectores diseminadores, transportando las esporas en la superficie de su exoesqueleto o en esporotecas análogas a los micangios. Estas asociaciones pueden tener un importante impacto sobre la relación y dinámica de la población de los escolítidos y sus hongos asociados (Lombardero *et al.* 2003, Hoffstetter *et al.* 2013, 2015).

Los hongos productores de mancha de la albura en coníferas corresponden en su mayoría a Ascomycetes pertenecientes al grupo llamado comúnmente como Ophiostomatales, cuyos principales géneros son, *Ophiostoma*, *Ceratocystiopsis* y *Grosmannia*. (Zipfel *et al.* 2006).

Comparten características similares en cuanto a su morfología y ecología (De Beer & Wingfield 2013), constituyendo un grupo polifilético con convergencia de caracteres morfológicos probablemente debido a su coevolución con artrópodos (De Beer *et al.*

2013). La característica principal que tiene este grupo es que producen sus esporas sexuales y asexuales en gotas mucilaginosas que se adhieren fácilmente a la superficie del cuerpo de los artrópodos vectores.

Los hongos Ophiostomatales constituyen un grupo polifilético que contiene aproximadamente 200 especies que se han clasificado primariamente en géneros tales como *Ceratocystis* Ellis/Halst., *Ceratocystiopsis* H.P. Upadhyay /W.B.Kendr., *Grosmannia* Goid. y *Ophiostoma* Syd./P.Syd cuya ubicación taxonómica ha estado sujeta a continuos debates durante los últimos 25 años. Además de su importancia como productores de mancha de albura, contienen especies patógenas (Wingfield *et al.* 1993; Jacobs & Wingfield 2001) entre las que se encuentra el patógeno ya mencionado *Ophiostoma ulmi*. Por otra parte, una especie relacionada a *Ophiostoma*, *Sporothrix shenkii* es un patógeno humano importante (Summerbell *et al.* 1993). Debido a la morfología relativamente simple y a la superposición de caracteres morfológicos entre las distintas especies, la taxonomía de este grupo ha sido varias veces revisada. A partir de estudios morfológicos, bioquímicos y filogenéticos, se estableció claramente la primer gran delimitación entre *Ceratocystis* que pertenece al orden Microascales y *Ophiostoma* al orden Ophiostomatales. Una característica importante que permite separar estos grupos es la composición química de la pared celular, *Ophiostoma* presenta celulosa y ramnosa, a diferencia de *Ceratocystis* que tiene fundamentalmente quitina, como la mayoría de los Ascomycetes (deHogg & Scheffer 1984). Además, *Ceratocystis* presenta sensibilidad a la cicloheximida que inhibe la síntesis proteica en la mayoría de los organismos eucariotas (Harrington 1981, Zipfel *et al.* 2006), mientras que las especies de *Ophiostoma* son tolerantes a altas concentraciones de cicloheximida. En cuanto a los anamorfos, *Ceratocystis* presenta formas asexuales con producción de conidios cuya pared se construye por deposición en anillo (Minter *et al.* 1983) mientras que los anamorfos de *Ophiostoma* producen conidios exógenos cuya pared se va formando por deposición apical difusa (Kirk *et al.* 2008).

Los estudios filogenéticos realizados en los últimos años han permitido definir 3 linajes, corroborados por caracteres morfológicos tales como, las estructuras reproductoras sexual y asexual con producción de esporas agrupadas en gotas mucilaginosas en los extremos de las fructificaciones o conidióforos largos, clara adaptación a la dispersión por insectos. Los teleomorfos (fase de reproducción sexual, se caracterizan por formar peritecios de base globosa con cuello muy largo, presentan ascos evanescentes y hialinos y las ascosporas son hialinas y presentan formas variadas (Hunt 1956, Upadhyay 1981, de

Hoog & Scheffer 1984, Wingfield *et al.* 1993, Jacobs y Wingfield 2001, Zipfel *et al.* 2006). Probablemente la similitud morfológica de los hongos Ophiostomatales es el resultado de la convergencia evolutiva que se expresa en adaptaciones a la dispersión por insectos (Spatafora & Blackwell 1994). El género *Ophiostoma* abarca un conjunto de especies y complejos de especies, es polifilético formando linajes vinculados a caracteres morfológicos. Contiene un espectro de anamorfos que van desde formas tipo *Hyalorhinocladiella* a las estructuras sinematosas de *Pesotum* o también tipo *Sporothrix*. Por otra parte, el género *Grossmania* se caracteriza por el anamorfo *Leptographium*, en tanto *Ceratocystiopsis* por poseer anamorfos tipo *Hyalorhinocladiella* y *Sporothrix*. La mayoría de los estudios sobre hongos Ophiostomatales hasta el siglo pasado fueron realizados en el hemisferio norte (Wingfield *et al.* 1993, Jacobs & Wingfield 2001). En los últimos años se han realizado numerosos estudios en el hemisferio sur, fundamentalmente en África y Australasia, elevando el número de especies conocidas a más de 390 (De Beer *et al.* 2012). En Sudamérica han sido registradas 43 especies (de Errasti 2016) siendo Argentina, Chile y Brasil los países en que se han realizado estudios. En el caso de Uruguay no hay antecedentes de estudios de los hongos Ophiostomatales asociados a la mancha de la madera.

Debido al impacto y la expansión que han tenido los escarabajos de corteza en las plantaciones de pino y la frecuente presencia de madera afectada por la mancha de la albura en nuestro país, planteamos el estudio de los hongos manchadores de madera asociados a los escolítidos en plantaciones de pino en Uruguay

OBJETIVO GENERAL

Conocer la microbiota productora de mancha de la albura asociada a los escarabajos de la corteza en plantaciones de pino en Uruguay.

Objetivo específico 1

Evaluar la presencia de hongos Ophiostomatoideos de tres especies de escolítidos presentes en plantaciones de distintas zonas del país.

Objetivo específico 2

Identificar las especies de hongos manchadores.

Objetivo específico 3

Establecer si existe especificidad hongo-escolítido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las plantaciones de pino con fines maderables en Uruguay se encuentran fundamentalmente concentradas en los Departamentos de Rivera y Tacuarembó, en la región sur-sureste en los Departamentos de San José y en la franja costera del Departamento de Rocha. En dichas zonas se eligieron sitios donde se detectaron focos de infestación por escolítidos (Gómez, comunicación personal), Figura 3.4.

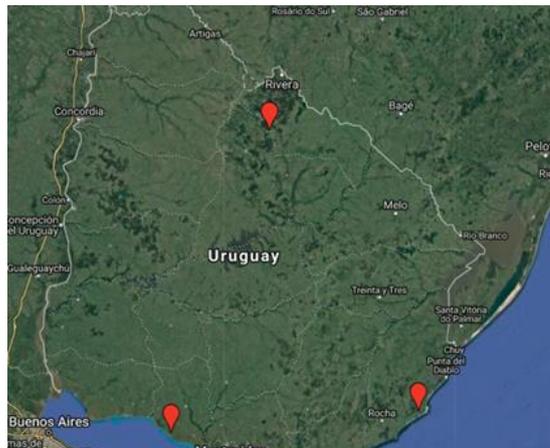


Figura 3.4 Sitios de muestreo correspondiente a plantaciones de pino donde se detectaron focos de ataque de escolítidos.

Se realizaron observaciones en una plantación de *Pinus taeda* en establecimiento La Corona (Tacuarembó), en plantaciones de *P. taeda*, *Pinus elliotti* y *Pinus marítima* en Puerto Arazatí (San José), donde hubo un ataque severo de escolítidos que llevó a la pérdida del 40% de los árboles y en una plantación sin manejo de *P. taeda*, *P. elliotti* y algunos ejemplares de *P. pinaster*, instalada en 1986 perteneciente al MGAP, ubicada en Cabo Polonio (Rocha). Se recolectaron ejemplares de escolítidos a partir de la corteza de árboles con ataque o de trozas apeadas en los lugares de muestreo. Se analizaron 72 individuos de *Hylurgus ligniperda*, 76 de *Orthotomicus erosus* y 83 de *Cyrtogenius luteus*. Cuando eran evidentes estructuras reproductoras fúngicas en las galerías producidas por los escolítidos, se tomaron muestras de la corteza y madera que presentaba signos de mancha en la albura. Las muestras fueron tomadas, en su mayoría, de troncos apeados en el campo y en menor cantidad de árboles en pie que presentaban signos de ataque por escolítidos, retirando la corteza en la zona basal del tronco. Las muestras fueron transportadas en tubos Eppendorf estériles al laboratorio y se colocaron en heladera hasta su procesamiento.

Aislamiento de hongos asociados a insectos y galerías

Para el aislamiento de los hongos asociados a los insectos, éstos se colocaron en freezer a -20°C durante 15 minutos y luego fueron colocados realizando una presión en placas de Petri conteniendo agar-extracto de malta al 2% con la adición de ciclohexamida (0.12g) y estreptomicina (0.02g) (Linnakosky *et al.* 2008). Para obtener los hongos de corteza y madera con galerías, se colocaron trozos de corteza en cámara húmeda a 25°C y 70% de humedad relativa durante 48 a 72 hs. De las fructificaciones presentes en la madera y corteza se tomaron gotas de esporas con aguja estéril y se sembraron directamente sobre el medio de cultivo Agar-extracto de malta (2%).

A medida que crecían las colonias provenientes de los insectos incubados, un disco de micelio se fue transfiriendo a placas conteniendo agar-extracto de malta (2%) para obtener cultivos puros.

Identificación

La identificación primaria de las especies, se realizó mediante la observación de las características macro y microscópicas de las colonias considerando la pigmentación de la colonia, presencia de fructificaciones y características de las mismas. Para la observación al microscopio se realizaron preparados montados en lactofenol-azul de algodón, se realizaron observaciones y se tomaron medidas de las estructuras reproductoras que presentaban. Luego se agruparon en morfotipos (aquellas colonias que presentaban macro y micromorfología similar fueron consideradas iguales) y se seleccionaron cepas correspondientes a cada morfotipo para realizar la identificación a nivel de especie mediante técnicas moleculares.

Se realizaron cultivos líquidos (en extracto de malta al 2%) de las cepas seleccionadas, se incubaron por 4-5 días hasta la formación de un biofilm de micelio, se extrajo el micelio que se secó sobre papel de filtro estéril y se procedió a la extracción de ADN genómico utilizando el KIT Ultraclean® (MoBio, Carlsbad, CA). Se amplificó las región ITS del DNAr utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, otra región utilizada fue la región de β -tubulina utilizando los cebadores β t-2a y β t-2b (Tabla 3.1). En todos los casos la mezcla de la reacción contenía 2,5 μL de Buffer 10X, 2,5 μL de dNTPs (2,5mM), 1,5 μL de MgCl_2 (25mM), 0,5 μL de cebador 1 (10 μM), 0,5 μL de cebador 2 (10 μM), 0,25 μL de Taq polimerasa, 15,25 μL de agua MQ libre de RNAsa y 2 μL de la muestra de ADN (50 μL de

volumen final). El control negativo se realizó utilizando la misma mezcla pero sin agregado de ADN y el control positivo se realizó utilizando una muestra que dio positiva en una reacción de PCR previa. Los parámetros de ciclado utilizados para la amplificación mediante PCR de la región ITS, β -tubulina fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (1:10 minutos a 94°C), hibridación (45 segundos a 50°C) y extensión (1 minuto a 72°C); seguidos de un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C y 5 minutos a 4°C.

Tabla 3.1 Cebadores utilizados en las PCRs

Región	Cebador	Dirección	Secuencia (5'-3')	Referencia
ADN ribosomal (ITS)	ITS 4	Reverso	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> (1990)
			GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG	
	ITS 5	Directo	G	White <i>et al.</i> (1990)
			ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT	Glass & Donaldson (1995)
	β t-2b	Reverso	GGC	
β - tubulina	β t-2a		GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson (1995)

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñidos con EZ Vision^R One (Amresco) y bajo luz UV en transiluminador. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA mass ruler 100pb.

Los productos de PCR, fueron secuenciados en MACROGEN, Corea. Las secuencias se corrigieron y se alinearon mediante ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), incluyendo las secuencias de cepas tipo obtenidas de la base de datos GenBank utilizando el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013).

Con las secuencias obtenidas se realizó una búsqueda BLAST con secuencias del GenBank con el programa MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.* 2011). Para el análisis filogenético, los alineamientos se realizaron mediante el software MAFFT 7.0 utilizando la estrategia E-INS-i. Los análisis de Máxima Parsimonia fueron realizados en PAUP 4.0. Se empleó la estrategia de búsqueda heurística utilizando el algoritmo TBR con 10.000 secuencias de adición al azar. Todos los caracteres fueron considerados del mismo peso y los gaps como caracteres faltantes. La robustez de los árboles obtenidos fue evaluada mediante 1.000 réplicas de Bootstrap. Los análisis de máxima verosimilitud fueron realizados utilizando el software PhyML 3.0. Los modelos de sustitución fueron seleccionados utilizando el criterio de información Akaike (CIA) en ModelTest 3.7. Los soportes estadísticos para cada nodo fueron estimados mediante 1.000 réplicas de Bootstrap.

RESULTADOS

Se analizaron 221 escarabajos de corteza, 72 pertenecientes a *H. lygniperda*, 76 a *O. erosus* y 83 a *C. luteus*. La frecuencia de colonización de los escarabajos por hongos Ophiotomatoides fue de 100% para *H. lygniperda* y *O. erosus*, mientras que para *C. luteus* fue menor, habiéndose encontrado el 25% de los individuos colonizados. Los aislados obtenidos de los escarabajos de la corteza y sus galerías presentaban características de *Ophiostoma* spp. con fructificaciones típicas de la reproducción sexual consistentes en peritecios globosos de cuello largo, o producción de las estructuras de reproducción asexual correspondientes a diferentes anamorfos. La mayoría de las colonias en cultivo presentaban una coloración castaña, que en algunos casos variaba a un tono más grisáceo o castaño oliva (Figura 3.5). Luego de 10 días de incubación se pudo observar, en muchas de ellas, la producción de abundantes gotas mucilaginosas conteniendo conidios producidos en estructuras más o menos organizadas, algunas sinematosas. En los cultivos provenientes de *C. luteus* se observó además la presencia de colonias formadas por micelio blanco con esporogénesis típica de *Sporothrix*.



Figura 3.5. Morfología de las colonias emergentes de los escarabajos en MEA ciclohexamida.

En las galerías presentes en las trozas de pino apeadas, provenientes de La Corona y Puerto Arazatí, se observaron fructificaciones correspondientes a peritecios con abundante producción de ascosporas (Figura 3.6) que fueron identificados como *Ophiostoma ips* por su morfología.

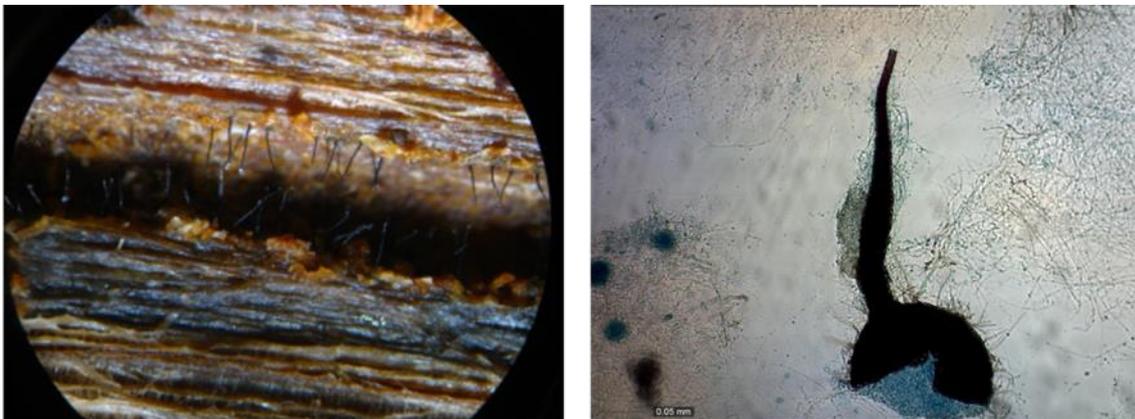


Figura 3.6. Troza de madera con galerías que presentan peritecios (izquierda), detalle de observación al microscopio de la morfología del peritecio y ascosporas (derecha).

De la observación al microscopio de los diferentes cultivos obtenidos y en base a las características micromorfológicas se pudieron identificar los anamorfos (forma asexual),

Pesotum, *Leptographium*, *Hyalorhinocladiella* y *Sporothrix*. De las fructificaciones sexuales, solo se observaron peritecios de *O.ips*.

Hyalorhinocladiella (anamorfo de *Ophiostoma ips*)

Se observaron los conidióforos típicos de este género (Figura 3.7). Presentan organización sinematosos, de 290 a 320 μm de largo. Los conidióforos se observaron solitarios o agrupados de 2 a 6. Los conidios son hialinos, unicelulares, cilíndricos, con el ápice redondeado y la base truncada de $5\text{--}8 \times 1.5\text{--}2.6 \mu\text{m}$.

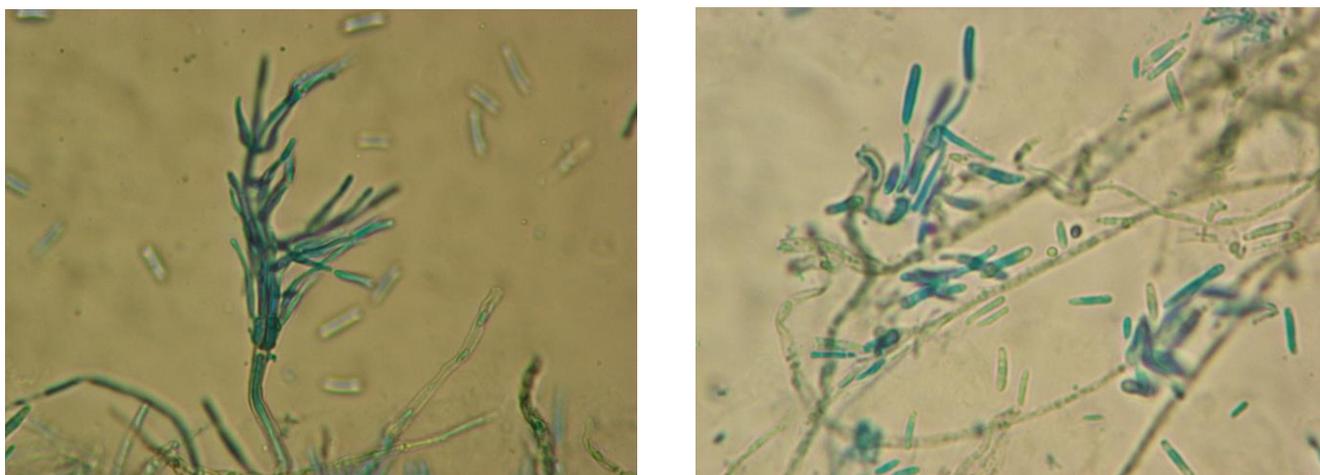


Figura 3.7. Conidióforos de *Hyalorhinocladiella* y conidios

Ophiostoma ips

Presenta el ascocarpo (peritecio) castaño oscuro a negro, sin hifas ostiolares en el ápice, su base es globosa, de 130 a 260 μm de diámetro. El cuello del peritecio varía en longitud de 300 a 750 μm . Los peritecios crecen superficialmente o levemente inmersos en medio de cultivo, desarrollándose a los 25 días de incubación. Los ascos son de tipo evanescentes. Las ascosporas son hialinas, aseptadas, de forma rectangular con una cubierta mucilaginosa, de $4.0\text{--}6$ (largo) \times $1.8\text{--}2$ μm (ancho) (Figura 3.8).

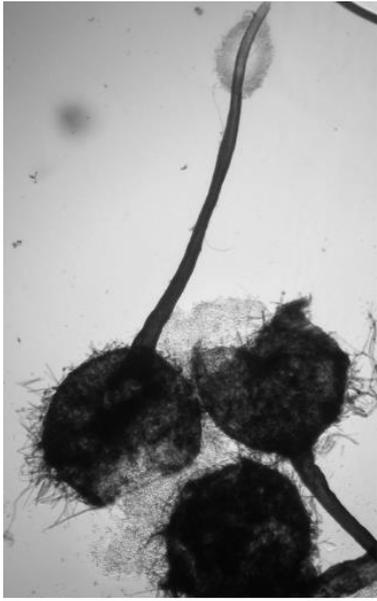


Figura 3.8. Peritecios de *O. ips* con masa mucilaginosa conteniendo ascosporas en extremo del cuello (izquierda). Detalle de ascosporas (derecha).

Leptographium

Presenta conidióforos solitarios, con 2 a 3 ramas laterales, tipo pinceles. Los conidióforos son pigmentados de color castaño-verdosos de 150-300 μm (Figura 5). Las células conidiógenas producen conidios agrupados en gotas mucilaginosas. Los conidios son rectangulares a oblongos con la base levemente truncada, hialinos de 3–4 \times 1–1.5 μm (1 x a) (Figura 3.9)

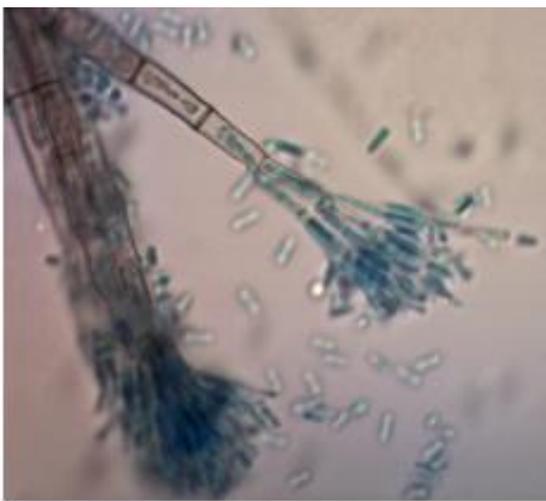


Figura 3.9. Conidióforos y conidios de *Leptographium* sp.

Pesotum

Presenta organización sinematosa, marrón oscura, con variación en el largo, algunos pueden alcanzar hasta 1500 μm de largo, pero presentan un rango de 200 a 1500 μm . La porción terminal donde porta las células conidiógenas presenta una organización flabelada. Los conidios son ovoides a cilíndricos (2.5-5 μm) (Figura 3.10).



Figura 3.10. Sinemas de *Pesotum* sp. Se observan hifas muy melanizadas que conforman las estructuras reproductoras asexuales sinematosas.

Sporothrix

Posee células conidiógenas que surgen simpodialmente de las hifas (Figura 3.11) conidios hialinos, lisos, ovoides a baciliformes $3.5-4 \times 1.5-2 \mu\text{m}$ (lxa).



Figura 3.11 *Sporothrix* sp. Conidióforos hialinos con conidios distribuidos simpodialmente, típico de este género.

De la comparación de las secuencias obtenidas de las regiones ITS y β tubulina la mayoría presentó alto porcentaje de similitud entre si y se establecieron 4 grupos. El resultado de la comparación de aquellas secuencias correspondientes al grupo más frecuente y que eran muy semejantes entre si, con las registradas en el GenBank, arrojaron un 95 a 99% de similitud con *O. ips*. Las secuencias correspondientes a aislados que presentaron diferentes morfologías y diferencias en sus secuencias se agruparon con cuatro especies que se presentan en el árbol filogenético (Figura 3.12).

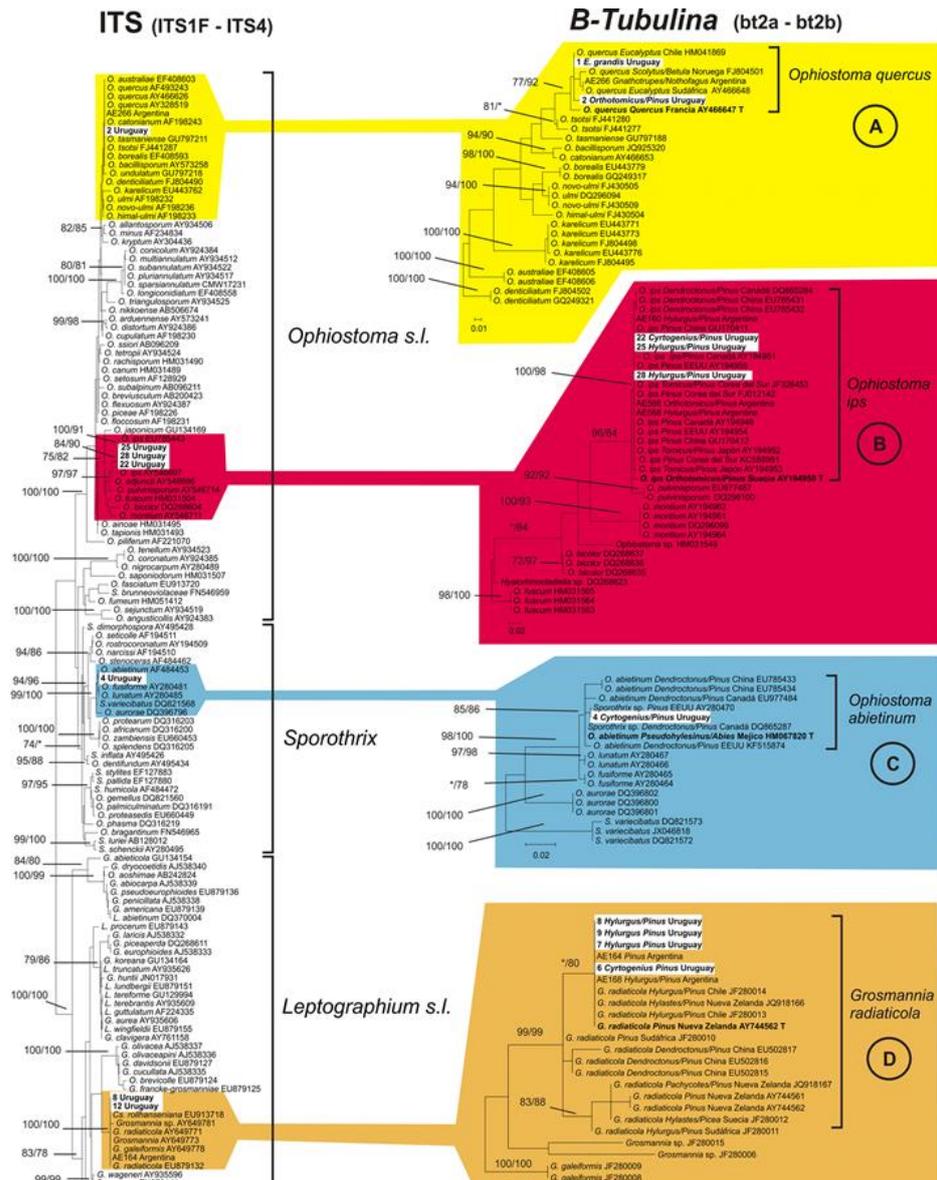


Figura 3.12 Árbol filogenético resultante de la comparación de las secuencias de las regiones ITS y β tubulina de especies de Ophiostomatales. Las matrices fueron construidas con secuencias de referencia descargadas del GenBank y los aislados del presente estudio (destacados en blanco). Los cultivos tipo se muestran resaltados en negra. Los valores de bootstrapp por encima del 70% están indicados en cada nodo como Maxima Parsimonia/Máxima Verosimilitud, los valores inferiores se detallan con*. Barra de referencia= diferencia nucleotídica entre taxones.

Se determinó que las especies *Ophiostoma ips*, *Ophiostoma abietinum*, *Ophiostoma quercus* y *Grosmannia radiaticola* pertenecientes al orden Ophiostomatales, están asociadas a escolítidos presentes en las plantaciones locales. La especie predominante fue *Ophiostoma ips*, presente en las tres especies de escolítidos analizados y en todas las plantaciones estudiadas. En cuanto al anamorfo de *Ophiostoma quercus*, fue aislado de *Orthotomicus erosus*, *Cyrtogenius luteus*. En el caso de *C. luteus*, como se mencionó, fue la especie de escolítido que presentó menor frecuencia de colonización por hongos, correspondiendo a solo el 25% de los individuos analizados. Esta especie también fue la única en estar asociado a *Sporothrix*, con alta frecuencia de colonización por este. En el análisis filogenético la secuencia correspondiente a la región ITS se agrupó con *O. abietinum*

DISCUSIÓN

Se comprobó que los escarabajos de la corteza presentes en las plantaciones de pino locales están íntimamente asociados a especies fúngicas que constituyen típicos agentes causales de mancha azul. Se identificaron cuatro especies, *O. ips*, *O. quercus*, *G. radiaticola* y *O. abietinum*. La especie predominante fue *O. ips*, en las tres especies de escolítidos analizados y en todos los sitios muestreados. Esta especie es bien conocida como productora de mancha de la albura, tiene una amplia distribución mundial y se la ha encontrado asociada a muchos escarabajos de la corteza de coníferas (Reay *et al.* 2005, 2006, Romón *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2001, 2004). Ha sido introducida en muchos países del hemisferio sur a través de la entrada accidental de escarabajos (Zhou *et al.* 2001, 2004, 2007). En Nueva Zelanda y en Sudáfrica, *O. ips* ha sido asociada a *H. ligniperda* con baja frecuencia y fundamentalmente en individuos adultos (Reay *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2001). Por el contrario, en Sudamérica, esta especie es muy frecuente, principalmente asociada a *H. ligniperda* en *Pinus radiata* en Chile (Zhou *et al.* 2004) y asociada a *Hylurgus* y *Orthotomicus* en dos especies de pino en Argentina (de Errasti *et al.* 2017). En España, esta especie fue mayormente asociada a *Orthotomicus erosus*, (Romón *et al.* 2007). En Sudáfrica, *Ceratocystiopsis minuta*, *Ophiostoma galeiforme*, *O. ips*, *Ophiostoma piceae*, *Leptographium lundbergii*, *L. serpens*, y *Pesotum* sp. fueron aislados de *H.*

lingiperda, y *O. ips*, *O. pluriannulatum*, *L. lundbergii*, *L. serpens*, y *Pesotum* sp. fueron aislados de *O. erosus* (Zhou *et al.* 2001). Basado en estos resultados y en los expuestos en nuestro trabajo se puede establecer que *O. ips* es la especie más frecuente en *H. lingiperda* como en *O. erosus*, en cambio la asociación con *C. luteus* es rara.

El amplio rango de especies de escolítidos con los que se asocia a *O. ips* indicaría que no existe una especificidad del hongo por el vector.

Ophiostoma quercus, asociado a *O. erosus* estuvo presente con baja frecuencia, fue identificada, en principio, como *Pesotum*, su anamorfo en cultivo. En general se trata de una especie que es frecuentemente encontrada en latifoliadas en países de la región como Argentina y Chile. Sin embargo, ha sido encontrada asociada a algunas especies de escolítidos en coníferas en España (Romón *et al.* 2007).

En cuanto a la presencia de *Grossmania radiaticola*, en este estudio se la encontró asociada a las *H. ligniperda* y *C. luteus*. Los cultivos presentaron las fructificaciones del anamorfo *Leptographium*, no observándose fructificaciones del teleomorfo. Esta especie fue originalmente descrita de madera con mancha de albura de *Pinus radiata* (Kim *et al.* 2005b). Sin embargo, en los últimos años ha sido encontrada en asociación con una variedad de escarabajos de la corteza de pino en diferentes países como Suecia (Linnakoski *et al.* 2012), USA (Kim *et al.* 2011) y Polonia (Jankowiak & Bilański 2013). En Sudamérica, se la ha encontrado sobre *Pinus radiata* en Chile en galerías de *Hylastes ater* e *Hylurgus ligniperda* (= *G. galeiformis* (Linnakoski *et al.* 2012, Zhou 2004) y en Argentina en galerías de *Hylurgus* de *P. radiata* con baja frecuencia (de Errasti *et al.* 2017). La baja frecuencia registrada en este trabajo sugeriría que esta especie no debe considerarse de importancia en el manejo de la mancha de la albura.

El escolítido *Cyrtogenius luteus*, si bien presentó una baja frecuencia de colonización por hongos manchadores fue la única especie de escarabajo del cual se obtuvieron aislados de *Sporothrix* sp. correspondiente a *Ophiostoma abietinum* a partir del análisis filogenético. Existen escasos registros de la asociación de hongos Ophiostomatales con estos escarabajos. Chang *et al.* (2017), encontraron especies de *Sporothrix* asociadas a *C. luteus*, en el que también analizaron los hongos presentes en los ácaros asociados a los escarabajos. De Beer *et al.* (2016) plantean que la mayoría de las especies de *Sporothrix* presentes en los escolítidos están en realidad asociadas a los ácaros que transportan los escolítidos.

La mayoría de los hongos asociados con los escarabajos de la corteza, están relacionados filogenéticamente, tienen ciclos de vida semejantes, utilizan probablemente los mismos recursos, el mismo espacio y son dispersados por los mismos hospedantes.

Las relaciones entre hongos y escolítidos son complejas y aun no bien comprendidas. Si bien ninguna de las especies fúngicas encontradas mostró especificidad por el vector, algunos aportes provenientes del estudio de la asociación entre otras especies de hongos Ophiostomatales y escolítidos de la corteza, pueden constituir un aporte para comprender la relación entre los hongos estudiados y los escolítidos con los que están asociados.

Los escolítidos de la corteza son floeófagos, es decir, obtienen su alimento directamente del floema del hospedante. El valor nutricional del floema es bajo para el requerimiento nutricional de un insecto, en particular, la concentración de nitrógeno resulta un factor limitante (Bleiker & Six 2007). Es probable y casi inevitable entonces, que las larvas consuman microorganismos como bacterias y levaduras que ellos introducen en la corteza y con los que coexisten en las galerías. Asimismo, los hongos filamentosos manchadores, asociados con los escolítidos, se extienden por el floema y la albura (Adams & Six 2008; Six & Wingfield 2011). Pese a que los tejidos vegetales son escasos en nitrógeno orgánico, la cantidad de nitrógeno que fluye por la albura no es despreciable y por lo tanto la albura podría constituir un reservorio del nitrógeno disponible, que los hongos conducirían hasta el floema y corteza donde se nutren las larvas. Bleiker & Six (2008) encontraron que el contenido de nitrógeno aumentaba en esos tejidos un 40% y Hodges *et al.* (1968) encontraron que el nitrógeno en el floema de *Pinus taeda* aumentaba considerablemente cuando *Dendroctonus frontalis* y sus hongos asociados se introducían en las cámaras de alimentación. Sin embargo, no todos los escolítidos de la corteza y sus hongos asociados tienen la misma capacidad de concentrar nitrógeno (Cook *et al.* 2010).

Otro desafío nutricional para los insectos que infestan plantas, es la obtención de esteroides. Los insectos requieren esteroides para producir hormonas y para su reproducción (Clayton 1964). Los hongos producen ergosterol que puede ser utilizado por la mayoría de los insectos, especialmente por aquellos que forman asociaciones simbióticas con hongos (Maurer *et al.* 2005; Norris *et al.* 1969).

Si estas relaciones tróficas de los escolítidos y los hongos Ophiostomatales de la corteza de *P. taeda* tuvieran lugar, entonces tendrían una relación más que asociativa, pudiéndose tratar, tal vez, de una relación de mutualismo facultativo ya que el escolítido aprovecharía a los hongos como proveedores de nutrientes, sin ser indispensables para su

supervivencia. Por su parte, los hongos verían asegurada su dispersión al ser transportados en los micangios o en el exoesqueleto asegurando la colonización de nuevos recursos (Six *et al.* 2003).

La obligatoriedad de la asociación hongo-escolítido de la corteza es muy difícil de demostrar debido a que establecen asociaciones con varias especies de hongos (Six & Wingfield 2011, Paine *et al.* 1997, Six & Paine 1998). La ventaja de la asociación de un escolítido con varias especies de hongos, consiste en que se aseguraría la permanencia de alguna de ellas frente a diferentes condiciones ambientales tales como temperatura, humedad u otros factores que pueden modificarse y afectar el desarrollo de alguna de ellas. Cuando una condición, por ejemplo la temperatura, no es favorable para una especie, puede serlo para otra, como fue observado por Six & Bentz (2007).

Esta asociación múltiple conduciría a una fuerte competencia entre simbioses, pero las diferencias entre los hongos en sus requerimientos abióticos o bióticos son las que determinan cual será el hongo dispersado por un escolítido. Un caso bien estudiado es el requerimiento diferencial de temperatura que alternativamente beneficia a un hongo u otro a medida que la temperatura fluctúa a lo largo de una estación. Este cambio de simbioses impulsado por la temperatura puede proporcionar un mecanismo que ha permitido a ambos hongos persistir en una simbiosis a largo plazo con su hospedante. Para los escolítidos que habitan en una amplia región geográfica y en hábitats variables, tener múltiples simbioses puede ser especialmente importante (Six & Benz 2007). Es por ello explicable que estas asociaciones hayan sido relativamente estables por prolongados periodos evolutivos (Six & Paine 1998).

A su vez, las relaciones entre los escolítidos y los hongos son multi compartidas, estando el escolítido asociado con dos o más organismos perteneciente a grupos taxonómicos diferentes. Las comunidades del tracto digestivo de los escolítidos tienen una alta diversidad de microorganismos asociados con ese nicho. Es poco conocida la función de estos microbios y sus potenciales interacciones con los hongos. Sin embargo, parece que algunos microbios que co-ocurren, impactan en la distribución de los hongos asociados mediante interacciones de colaboración o antagonismo con efectos indirectos importantes sobre el escolítido hospedante (Six 2013). Así, algunos ácaros llevados sobre los escolítidos poseen una estrecha simbiosis con los hongos Ophiostomatales. Estos ácaros se alimentan y son vectores de los hongos presentando en su exoesqueleto esporotecas análogas a los micangios. Estas asociaciones pueden tener un importante impacto sobre

la relación y dinámica de la población de los escolítidos y sus hongos asociados. (Lombardero *et al.* 2003, Hoffstetter *et al.* 2006).

Es muy probable que las especies de escolítidos que han sido analizados contengan una compleja comunidad de microorganismos constituida por numerosos taxa que los benefician en su nutrición como también se benefician los hongos en su dispersión y adquisición de nuevos recursos.

Desde el punto de vista ecológico, asociaciones como las estudiadas entre escolítidos y hongos reflejan la intrincada red que opera en las distintas etapas del proceso de degradación de la materia orgánica. Estos hongos Ophiostomatales simbioses reducirían la actividad degradadora de los hongos descomponedores de madera a través de interacciones competitivas con estos (Skelton *et al.* 2020).

Si bien la mayoría de los escarabajos de la corteza y sus hongos asociados, colonizan, en general, árboles debilitados o senescentes, se considera que pueden constituir serias amenazas con un gran potencial invasivo cuando son introducidos a nuevos ambientes a través del traslado de madera o productos derivados de ésta (Wingfield *et al.* 2017).

BIBLIOGRAFÍA

Adams AS & Six DL (2008). Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Can Entomol.* 140:124–127.

Bleiker K P & Six DL (2007). Dietary benefits of fungal associates to an eruptive herbivore: Potential implications of multiple associates on host population dynamics. *Environ. Entomol.* 36: 1384–1396.

Ballard RG, Walsh MA & Cole WE (1982). Blue-stain fungi in xylem of lodgepole pine: a light-microscope study on extent of hyphal distribution. *Canadian Journal of Botany* 60: 2334–2341.

Bertheau C, Salle A, Roux-Morabito G, Garcia J, Certain G & Lieutier F (2009). Preference–performance relationship and influence of plant relatedness on host use by *Pityogenes chalcographus* L. *Agricultural and Forest Entomology* 11: 389-396.

Bleiker K & Six DL (2008). Competition and coexistence in a multi-partner mutualism: Interactions between two fungal symbionts of the mountain pine beetle in beetle-attacked trees. *Microb Ecol.* 57: 191-202.

Brasier CM (1991). *Ophiostoma novo-ulmi* sp.nov., causative agent of the current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* 115: 151-161.

Byrne T, Woo KL, Uzunovic A & Watson PA (2005). An annotated bibliography on the effect of bluestain on wood utilization with emphasis on mountain pine beetle-vectored bluestain. Working Paper 2005–4. Canadian Forest Service, Victoria. Canada. 58 pp.

Chang R, Duong TA, Tareum SJ, Wingfield MJ, Zhou X & Beer ZW (2017). Ophiostomatoid fungi associated with conifer-infesting beetles and their phoretic mites in Yunnan, China. *Myckeys* 28: 19-64.

Clayton RB (1964). The utilization of sterols by insects. *J Lipid Res.* 5: 3-9.

Cook SP, Shirley BM & Zambino PJ (2010). Nitrogen concentration in mountain pine beetle larvae reflects nitrogen status of the tree host and two fungal associates. *Environ Entomol.* 39: 821-826.

De Beer ZW, Duong TA & Wingfield MJ (2016). The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: Solution to a problematic relationship. *Studies in Mycology* 83: 165-191.

De Beer ZW, Seifert KA & Wingfield MJ (2012). A nomenclator for ophiostomatoid genera and species in the Ophiostomatales and Microascales. In: Seifert KA & Wingfield MJ (eds.). *The Ophiostomatoid Fungi*. CBS. Utrecht. The Netherlands.

De Beer ZW, Seifert KA & Wingfield MJ (2013). The ophiostomatoid fungi: Their dual position in the Sordariomycetes. In: Seifert KA & Wingfield MJ (eds.). *The Ophiostomatoid Fungi*. CBS. Utrecht. The Netherlands.

De Beer, ZW & Wingfield MJ 2013. Emerging lineages in the Ophiostomatales. En: K.A. Seifert and M.J. Wingfield (Editors), *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS, Utrech, The Netherlands

de Errasti A (2016). Hongos manchadores de albura en especies forestales exóticas y nativas de los Andes patagónicos: taxonomía, patogenicidad y manejo. Tesis de Doctorado. Biblioteca digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires. 233 pp.

de Errasti A, Pildain MB & Rajchenberg M (2017). Ophiostomatoid fungi isolated from three different pine species in Argentinian Patagonia. *Forest Pathology* 48: 1-11.

De Hoog GS & Scheffer RJ (1984). *Ceratocystis* versus *Ophiostoma*: A Reappraisal. *Mycologia* 76: 292-299.

Encinas O & Daniel G (1995). Wood cell wall biodegradation by the blue stain fungus *Botryodiplodia theobromae*. *Pat. Mat. Org.* 29: 255-272.

Glass NL & Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1323–1330.

Gómez D (2015). Escolítidos del Uruguay, situación actual y perspectivas, INIA, Serie de actividades de difusión No 750.

Gómez D (2014). Diversidad y Estacionalidad de Escarabajos de Corteza (Coleoptera: Scolytinae) en *Pinus taeda* L. en Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA. UDELAR. 99pp.

Gómez D & Martínez G (2013). Bark beetles in pine tree plantations in Uruguay: first record of *Orthotomicus erosus* Wollaston (coleoptera: Curculionidae:Scolytinae) The Coleopterists Bulletin 67: 470-472.

Gómez D, Martínez G & Beaver RA (2012). First Record of *Cyrtogenius luteus* (Blandford) (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae) in the Americas and its Distribution in Uruguay. The Coleopterists Bulletin 66: 362-364.

Happ GM, Happ CM & French JRJ (1976). Ultrastructure of the mesonotal mycangium of an ambrosia beetle, *Xyleborus dispar* (F.) (Coleoptera: Scolytidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 5: 381-391.

Harrington TC (2005). Ecology and Evolution of Mycophagous Bark Beetles and Their Fungal Partners. In Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution. Vega FE & Blackwell M (eds.). Oxford University Press. Oxford. UK. pp. 257-291.

Harrington TC (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. Mycologia 73: 1123-1129.

Harrington TC (1993). Diseases of conifers caused by *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: Wingfield MJ, Seifert KA & Webber JF (eds.) *Ceratocystis* and *Ophiostoma*, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp. 161-172.

Hodges JD, Barras SJ & Mauldin JK (1968). Amino acids in inner bark of loblolly pine, as affected by the southern pine beetle and associated microorganisms. Can J Bot. 46: 1467-1472.

Hofstetter RW, Cronin J, Klepzig KD, Moser JC & Ayres MP (2006). Antagonisms, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of the southern pine beetle. Oecologia 147: 679-91.

Hofstetter RW, Dinkins-Bookwalter J, Davis TS & Klepzig KD (2015). Symbiotic Associations of Bark Beetles. In: Vega FE & Hofstetter RW (eds.). *Bark Beetles Biol. Ecol. Nativ. Invasive Species*. Academic Press. pp. 209-245.

Hofstetter RW, Moser JC & Blomquist SR (2013). Mites associated with bark beetles and their hyperphoretic ophiostomatoid fungi. In: Seifert KA, de Beer ZW & Wingfield MJ (eds.). *Ophiostomatoid Fungi Expand. Front. CBS Biodiversity Series*. pp. 165-176.

- Hunt J (1956). Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 19: 1-58.
- Jacobs K & Wingfield MJ (2001). *Leptographium* species. Tree pathogens, insect associates and agents of blue stain. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp. 18-23.
- Jacobs K, Wingfield MJ, Coetsee C, Kirisits T & Wingfield BD (2001). *Leptographium guttulatum* sp. nov., a new species from spruce and pine in Europe. *Mycologia* 93: 380-388.
- Jankowiak R & Bilański P (2013). Ophiostomatoid fungi associated with root-feeding bark beetles on Scots pine in Poland. *Forest Pathology* 43: 422-428.
- Kim JJ, Lim YW, Seifert KA, Kim SH, Breuil C & Kim GH (2005). Taxonomy of *Ophiostoma radiaticola* sp. nov. (Ophiostomatales, Ascomycetes), the teleomorph of *Pesotum pini*, isolated from logs of *Pinus radiata*. *Mycotaxon* 91: 481-496.
- Kim S, Harrington TC, Lee JC, Seybold SJ. (2011). *Leptographium tereforme* sp. nov. and other Ophiostomatales isolated from the root-feeding bark beetle *Hylurgus ligniperda* in California. *Mycologia*. 103:152-163. doi:10.3852/10-096
- Kirisits T (2007). Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Gregoire J-C, Evans HF (eds.). *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp 181-236.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW & Stalpers JA (2008). *Dictionary of the Fungi*. 10th edition. CABI. UK.
- Lantschner MV, Atkinson TH, Corley JC & Liebhold AM (2017). Predicting North American Scolytinae invasions in the Southern Hemisphere: *Ecol Appl*. 27: 66-77.
- Lekander B, Bejer-Petersen B, Kangas E & Bakke A (1977). The distribution of bark beetles in the Nordic countries. *Acta Entomologica Fennica* 32. pp.37.
- Linnakoski R, De Beer ZW, Duong TA, et al. (2012). *Grosmannia* and *Leptographium* spp. associated with conifer-infesting bark beetles in Finland and Russia, including *Leptographium taigense* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 102: 375-399.
- Linnakoski R, de Beer ZW, Rousic M, Niemelä P, Papp A & Wingfield MJ (2008) Fungi, including *Ophiostoma karelicum* sp. nov., associated with *Scolytus ratzeburgi* infesting birch in Finland and Russia. *Mycological Research* 12: 1475-1488.

Lombardero MJ, Hofstetter RW, Ayres MP, Klepzig KD & Moser JC (2003). Strong indirect interactions among *Tarsonemus* mites (Acarina: Tarsonemidae) and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Oikos* 102: 342-52.

Marchant KR & Borden JH (1976). Worldwide introduction and establishment of bark and timber beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). Burnaby BC, Canada: Simon Fraser University. Pest Management Papers No. 6.

Maurer P, Debieu D, Leroux P, Malosse C, Riba G (2005). Sterols and symbiosis in the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae: Attini). *Arch Insect Biochem Physiol.* 20: 13-21.

Meurisse N, Rassati D, Hurley BP, Brockerhoff EG & Haack RA (2019). Common pathways by which non-native forest insects move internationally and domestically. *J Pest Sci.* 92: 13-27.

Minter DW (1983). Redisposition of *Klasteroskya* in the Ophiostomataceae. *Transactions of the British Mycological Society* 80: 162-163.

Norris DM, Baker JM & Chu HM (1969). Symbiotic Interrelationships between microbes and ambrosia beetles III. Ergosterol as the source of sterols to the insect. *Ann Entomol Soc Am.* 62: 413-414.

Paine, TD, Raffa KF & Harrington TC (1997). Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Reviews in Entomology* 42: 179-206.

Parra P (1996). Estudio de los antecedentes biológicos y patrones de ataque en *Pinus radiata* D. Don de *Hylurgus ligniperda* (F.) (Coleoptera:Scolytidae) en la zona de Concepción VIII Región. Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 57pp.

Raffa KF, Grégoire JC & Lindgren BS (2015). Natural History and Ecology of Bark Beetles. In: Vega FE & Hofstetter RW (eds.). *Bark Beetles Biol. Ecol. Nativ. Invasive Species*. Academic Press, San Diego. pp. 1-40.

Reay S, Thwaites J & Farrell R (2005). A survey of *Ophiostoma* species vectored by *Hylastes ater* to pine seedlings in New Zealand. *Forest Pathology* 35: 105-113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00393.x>.

Reay, SD, Thwaite JM, Farrell RL (2006). Survey of Ophiostomataceae associated with *Hylurgus ligniperda* (Curculionidae: Scolytinae) in New Zealand. *N. Z. Entomol.* 29: 21-26.

Rodríguez J, & Arriaga F (1988). Patología de la madera. En: Curso de Construcción en Madera. Colegio Oficial de Arquitectos de Madrid. España. pp. 205-236.

Romón P, Zhou X, Iturrondobeitia JC, Wingfield MJ & Goldarazena A (2007). *Ophiostoma* species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in northern Spain. *Can. J. Microbiol.* 53: 756-767.

Ruffinelli A (1967). Insectos y otros invertebrados de interés forestal. *Silvicultura, Uruguay* 17: 5-79.

Sauvard D (2004). General Biology of Bark Beetles. In: Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire JC & Evans HF (eds.). *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Academic Press. Dordercht. pp. 63-88.

Seifert KA (1993). Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: *Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. Wingfield MJ, Seifert KA & Webber JF (eds.). APS Press St. Paul, Minnesota. pp. 141-151.

Six DL (2013). The Bark Beetle Holobiont: Why Microbes Matter. *2013 J Chem Ecol.* 39: 989-1002.

Six DL & Bentz BJ (2007). Temperature determines symbiont abundance in a multipartite bark beetle-fungus ectosymbiosis. *Microbial Ecology* 54: 112–118.

Six DL, Harrington TC, Steimel J, McNew D & Paine TD (2003). Genetic relationships among *Leptographium terebrantis* and the mycangial fungi of three western *Dendroctonus* bark beetles. *Mycologia* 95: 781-792.

Six DL, Wingfield MJ (2011). The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Ann. Rev Entomol.* 56: 255-272.

Six, DL & Paine TD (1998). Effects of mycangial fungi and host tree species on progeny survival and emergence of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 27: 1393-1401.

Skelton JA, Loyd J, Smith A, Blanchette RA, Held BW & Hulcr J (2020). Fungal symbionts of bark and ambrosia beetles can suppress decomposition of pine sapwood by competing with wood-decay fungi. *Fungal Ecol.* Vol. 45 <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100926>.

Spatafora JW & Blackwell M (1994). The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. *Mycological Research* 98: 1-9.

Summerbell RC, Kane K, Krajden S & Duke EE (1993). Medically important *Sporothrix* species and related Ophiostomatoid fungi. En: *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology, and pathogenicity. Wingfield MJ, Seifert KA & Webber JF (eds.). American Phytopathological Society Press. St Paul, Minnesota. USA 185-192p.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Upadhyay HP (1981). A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens. GA. USA. p176.

Webber JF & Brasier CM (1984). The transmission of Dutch elm disease: A study of the processes involved. En: *Invertebrate-Microbial Interactions*. Anderson, J.M., A.D.M. Rayner, and D. Walton (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK pp. 271 -306

Wingfield MJ, Slippers B & Wingfield BD (2010). Novel associations between pathogens, insects and tree species threaten world forests. *N Z J For Sci.* 40: S95-S103.

Wingfield MJ, Barnes I, de Beer ZW, Roux J, Wingfield BD & Taerum SJ (2017). Novel associations between ophiostomatoid fungi, insects and tree hosts: current status future prospects. *Biol Invasions.* 19: 215-3228.

White TJ, Bruns TD, Lee SB & Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols and Applications. A Laboratory Manual* (eds. MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky and TJ White). Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

Whitney HS (1982). Relationships between bark beetles and symbiotic organisms. In: Mitton JB, Sturgeon KB (eds). Bark Beetles in North American Conifers. University of Texas Press. Austin. TX, pp 183–211

Wood SL & Bright DE (1992). A catalog of Scolytodae and Platypodidae (Coleoptera), Part 2: Taxonomic Index. Great Basin Naturalist Memoirs 13: 1-1553.

Yan Z, Sun J, Don O & Zhang Z (2005). The red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* Le Conte (Scolytidae): An exotic invasive pest of pine in China Biodiversity and Conservation 14: 735-1770.

Zeff C (1999). Forestry practices to minimise sapstain. In: Kreber B. (ed.). The Second New Zealand Sapstain Symposium. Proceedings of Symposium held Rotorua, 18–19.

Zipfel RD, de Beer ZW, Jacobs K, Wingfield BD & Wingfield MJ (2006). Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. Stud. Mycol. 55: 75–97.

Zhou X, De Beer Z, Wingfield B & Wingfield M (2001). Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. Sydowia 53: 290-300.

Zhou XZ, De Beer W, Ahumada R, Wingfield B & Wingfield M (2004). *Ophiostoma* and *Ceratocystiopsis* spp. associated with two pine-infesting bark beetles in Chile. Fungal Diversity 15: 253-266.

Zhou X, Burgess T, De Beer Z W, Lieutier F, Yart A, Klepzig K, Carnegie A, Portales JM, Wingfield BD En: Wingfield MJ (2007). High intercontinental migration rates and population admixture in the sapstain fungus *Ophiostoma ips*. Molecular Ecology 16:89-99.

Capítulo 4

Actividad degradadora de Basidiomycetes sobre madera aserrada de *Pinus taeda* y efecto de la modificación térmica en su durabilidad

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, *Pinus taeda* es la principal especie de pino plantada con fines maderables para construcción y carpintería. Su geometría axial permite la transformación eficiente mediante aserrado o debobinado para la fabricación de productos para la construcción y carpintería. En segundo lugar, en cuanto a superficie plantada con pinos, se encuentra *P. elliotti*, especie que presenta características similares y constituyen ambas, un cuarto de la superficie forestal plantada (MGAP 2018). Debido a sus propiedades físicas similares (Clark & Saucier 1989), estas dos especies generalmente se plantan mezcladas indistintamente en el mismo rodal. Las condiciones presentes en Uruguay les permiten tasas de crecimiento anual promedio de 19 a 24 m³/ha (Ramos & Cabrera 2001, Morales 2007, Cabbage *et al.* 2010) y ciclos de corte de 25 años para la madera. Según la norma EN 1310 (Comité Europeo de Normalización [CEN] 1997) y el rango comúnmente aceptado de 20 a 30 m³/ha, se trata de especies de rápido crecimiento. Como resultado del rápido crecimiento, la madera muestra altos porcentajes de madera juvenil, lo que la diferencia de la de los pinos cosechados en rodales naturales de crecimiento más lento (Moya *et al.* 2013, Cagno *et al.* 2013). Las industrias de madera blanda y madera contrachapada en Uruguay utilizan árboles relativamente jóvenes en condiciones de rotación corta (aproximadamente 20 años). Se puede predecir que en los próximos años debido a aumento de la demanda de productos de madera a nivel global se incremente el uso de estas especies. Adicionalmente, las políticas gubernamentales de promoción del uso de la madera en la construcción es probable que provoquen un aumento del uso local de este recurso natural (Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente [MVOTMA] 2011, Gabinete Productivo 2012).

El uso de la madera de pino en el sector de la construcción es una oportunidad de mercado en la industria maderable. En Uruguay la construcción con madera es incipiente, aunque creciente: entre 2000 y 2015 la demanda estimada de madera aserrada creció más de 40%, y la de tableros contrachapados se multiplicó por 14 (Boscana *et al.* 2016).

La madera de pino se clasifica como madera poco durable pues presenta baja durabilidad natural dada su escasa resistencia al ataque de hongos e insectos, estimándose que a la intemperie y en contacto con el suelo su vida útil es de aproximadamente 5 años.

La madera de las coníferas presenta una estructura anatómica relativamente homogénea. El tejido consiste fundamentalmente de traqueidas (90–95%), que cumplen tanto la función de soporte, de transporte de agua y minerales disueltos y de tejido parenquimático formando radios uniseriados con disposición radial. La presencia de canales resiníferos rodeados de células parenquimáticas también es frecuente. Las traqueidas son células muertas elongadas con pared lignificada que le dan resistencia y firmeza a la madera. En cambio, la madera de las angiospermas presenta una estructura más heterogénea y compleja, con división funcional entre los diferentes componentes celulares, tales como fibras, traqueidas, vasos y células parenquimáticas, de los cuales, los vasos son los más característicos y donde las funciones de sostén y transporte están separadas (fibras y vasos respectivamente) (Jane, 1956; Panshin & Zeeuw 1970; Daniel 2016). Las paredes de los diversos tipos celulares presentes en la madera están constituidas por diferentes proporciones de celulosa, lignina y hemicelulosa. La madera de las coníferas tiene mayor proporción de lignina y menor de hemicelulosas que la de angiospermas.

En la naturaleza los hongos juegan un papel primordial como degradadores y recicladores de materia orgánica sobre todo de origen vegetal, beneficiando los ecosistemas de bosques en la reincorporación de CO₂ a la atmósfera y de nutrientes al suelo. La biodegradación de los materiales leñosos, que constituyen la fuente de biomasa más abundante en la tierra, es uno de los procesos más importantes en estos ecosistemas. Los hongos de la podredumbre de maderas pertenecientes, en su gran mayoría, a la subdivisión Basidiomycota son de los pocos organismos capaces de utilizar y degradar prácticamente todas las formas de carbono orgánico presente en los tejidos leñosos (Bagley & Richter 2002). Estos pueden causar diferentes tipos de podredumbres como la podredumbre blanca, la podredumbre castaña o la blanda. La velocidad de colonización, descomposición y remoción de los componentes estructurales de la madera pueden variar mucho según el tipo de podredumbre, de especie fúngica y de las cepas (Blanchette 1991). Como fue descrito muy tempranamente por Hartig (1874), un hongo en particular causa un tipo específico de podredumbre y este tipo será siempre el mismo independientemente del tipo de madera, ya sea de conífera o de latifoliada. Por lo tanto, si se encuentran fructificaciones de un Basidiomycete sobre un árbol en pie, madera almacenada o en una construcción se puede determinar qué tipo de podredumbre presenta ese material. Los

Basidiomycetes degradadores de madera producen una batería de enzimas extracelulares que son las responsables de la degradación de los componentes estructurales de las paredes celulares. Básicamente poseen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: un sistema hidrolítico responsable de la degradación de polisacáridos, consistentes fundamentalmente de xilanasas y celulasas y un sistema lignolítico que degrada la lignina, este sistema comprende principalmente lacasas, ligninasas y peroxidasas (Eriksson, Blanchette & Ander 1990, Peralta *et al.* 2017).

Entre las especies de hongos de la podredumbre, algunas pueden afectar árboles en pie, siendo las más frecuentes *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Hypholoma fasciculare*, *Pleurotus ostreatus*. En tanto otras como *Schizophyllum commune*, *Stereum* spp., *Trametes versicolor* producen podredumbre en árboles muertos o madera apeada. Todas estas especies producen podredumbre blanca. Este tipo de podredumbre ocurre en general en especies de latifoliadas, en las que degradan fundamentalmente lignina y hemicelulosa, y por último celulosa. La consistencia de la madera resulta fibrosa, pierde resistencia y adquiere un color blanquecino. Existen dos tipos de podredumbre blanca, la selectiva y la simultánea (Schwarze *et al.* 2000). En la primera hay una delignificación selectiva, donde las enzimas liberadas por la hifa en el lumen celular difunden dentro de la pared secundaria causando la degradación de la lignina y de la laminilla media. Posteriormente, la degradación preferencial de la lignina provoca una separación de las células mientras la celulosa permanece. En la delignificación simultánea, la descomposición comienza cercana a la hifa, de modo que la pared celular se va degradando progresivamente desde el lumen y las hifas penetran en ángulo recto dentro de la pared, descomponiendo por último la laminilla media. Algunas especies de Basidiomycetes tienen la capacidad de metabolizar grandes cantidades de lignina en la madera y esta característica es única entre los microorganismos.

Otro grupo de hongos son productores de la podredumbre castaña, como *Laetiporus sulphureus*, en árboles en pie, en tanto *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana*, *Serpula lacrimans* o *Fomitopsis lilacinogilva* atacan madera de árboles muertos, crecen fundamentalmente en coníferas y representan solo el 7% de la diversidad de los Basidiomycetes de la podredumbre de madera (Liese 1970, Wilcox *et al.* 1974). Estos son los descomponedores más importantes en los ecosistemas de bosque de coníferas en el hemisferio norte (Arantes & Goodell 2014). A diferencia de los hongos de podredumbre blanca, degradan los polisacáridos de la madera modificando solo parcialmente la lignina produciéndose una rápida despolimerización de la celulosa y

hemicelulosa durante las etapas iniciales de la colonización. Como resultado, la madera adquiere una coloración castaña debido a la lignina oxidada y se quiebra en segmentos cúbicos (Gilbertson 1980, Monrroy *et al.* 2011) produciéndose una drástica reducción de la elasticidad y resistencia atribuible fundamentalmente a la degradación de la hemicelulosa (Schwarze 2000).

Para evitar la acción de los hongos degradadores y mejorar la durabilidad de la madera aserrada, los sistemas convencionales de preservación generalmente implican la impregnación en profundidad con biocidas ampliamente activos en la madera (Barnes *et al.* 1995). La impregnación consiste en forzar dentro de la madera, mediante vacío y presión, la solución de tratamiento. Actualmente en Uruguay, la madera para la construcción se protege en general con sales de arsénico, cromo y cobre (CCA), estas sustancias son efectivas en el control de hongos e insectos, pero representan un serio problema ambiental. Este método de conservación de maderas ampliamente utilizado fue prohibido o severamente restringido en EEUU, Canadá, CCEE, Japón, Australia y Nueva Zelanda, debido al impacto ambiental que generan los compuestos químicos (Dieste 2014, Hingston 2001). Se puede afirmar que los países del mundo que son grandes usuarios de madera para la construcción restringen o prohíben el uso de CCA, ya que su disposición final implica el aporte de metales tóxicos al ambiente.

La creciente demanda de madera por la industria de la construcción, producto de la necesidad de limitar las emisiones de gases de efecto invernadero provocadas por uso de materiales como el acero y el hormigón armado, sumado a la restricción en el uso de biocidas como protectores de madera, y la prohibición del uso de maderas tropicales de alta durabilidad natural, pero extraídas de lugares ambientalmente sensibles, impulsó el desarrollo de tecnologías alternativas, como la modificación química y térmica (Verma *et al.* 2008, Hill 2007). Si bien estos procesos tienen como objetivo principal brindar protección frente al ataque de hongos degradadores e insectos a su vez mejoran las propiedades de la madera como la estabilidad dimensional, compresión, dureza y estabilidad contra la radiación UV (Hill 2007). La modificación consiste en la alteración de las paredes celulares de la madera, mediante la reacción de los elementos constitutivos de la misma (celulosa, lignina y hemicelulosa) provocando cambios irreversibles, tales como la disminución de su higroscopicidad y el aumento de su durabilidad, sin transformarse en un producto final tóxico (Hill 2007, Militz & Altgen 2014). La modificación térmica de la madera consiste en una operación unitaria que se realiza en madera ya seca (con un contenido de humedad cercano al 10% en base seca) con el

objetivo de aumentar la estabilidad dimensional y la resistencia al ataque de organismos. El proceso consiste en calentar la madera por encima de 150 °C y hasta 220°C, por un período de tiempo determinado que provoca la degradación auto-catalítica de las hemicelulosas constitutivas de la pared celular (Windeisen *et al.* 2009; Moura *et al.* 2012). Técnicamente, es un proceso relativamente simple de implementar, tiene un bajo consumo energético, y no requiere impregnación química adicional (Poncsak *et al.* 2006). Existen escasos estudios que vinculen directamente la degradación de la pared celular con la actividad xilófaga de los Basidiomycetes (Weiland & Guyonnet 2003), y no existen hasta la fecha estudios sobre madera de *P. taeda*, de procedencia local, modificada térmicamente e inoculada con Basidiomycetes. La modificación térmica de la madera produce condiciones desfavorables para la colonización fúngica dado que, al descomponerse las hemicelulosas, que constituyen la fuente de energía inicial para el desarrollo de los hongos, se limita su crecimiento. Por otra parte, para que se produzca la colonización y las enzimas fúngicas puedan actuar, los hongos requieren un contenido de agua en la madera superior al punto de saturación de las fibras, es decir cuando toda el agua presente se encuentra unida a las paredes celulares (Griffin 1977) y corresponde, en general al 27-30 % del peso de la madera sana. Por encima de este punto, el agua está disponible en el lumen de las células de la madera (Eaton & Hale 1993) mientras que, por debajo de este nivel, el agua se hace rápidamente inaccesible a las hifas fúngicas. Se puede explicar así el hecho que, en general, el límite más bajo de potencial mátrico para el crecimiento de los Basidiomycetes de la podredumbre es aproximadamente -40 a -50 bar (Griffin 1977). Estudios realizados con hongos de la podredumbre blanca y castaña, en maderas de coníferas y latifoliadas con baja durabilidad, tratadas con calor mostraron que la pérdida de masa era del 1% frente a las no tratadas que era del 40% (Dirol & Guyonnet 1993). En maderas de varias especies de pino tratadas con calor Elaieb *et al.* (2015) encontraron que aumenta la resistencia a la descomposición producida por hongos tanto de la podredumbre blanca como castaña. De las 250 a 300 especies de Basidiomycetes registradas para nuestro país hasta el momento, la mayor parte producen podredumbre blanca y apenas una decena producen podredumbre castaña. Muchas de las especies colectadas sobre madera de la flora nativa son de distribución cosmopolita siendo solo algunas colonizadoras frecuentes de maderas de *Pinus* spp. y *Eucalyptus* spp. (Martínez 2014).

Trametes versicolor y *Gloeophyllum trabeum* son dos especies con amplia distribución en el país, colonizando madera de diferentes especies arbóreas. Estas son dos de las especies utilizadas para ensayos de durabilidad de madera por la norma internacional EN 113 (CEN 1996, Verma *et al.* 2008)

El propósito de este trabajo fue analizar la actividad de hongos de la podredumbre de distribución local sobre la degradación de madera de *Pinus taeda* a fin de mejorar su durabilidad. Se propone entonces, estudiar la capacidad de Basidiomycetes de la podredumbre blanca y castaña de colonizar y degradar tablas aserradas secas *Pinus taeda* sin ningún tratamiento. Por otra parte, se determinó el efecto de la modificación térmica en la durabilidad de la madera frente a la colonización por estos mismos hongos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad degradadora de hongos descomponedores de la madera sobre tablas aserradas de *Pinus taeda*.

Objetivo específico 1

Determinar la capacidad de *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* de colonizar y degradar tablas aserradas secas de *P. taeda*.

Objetivo específico 2

Evaluar la efectividad del tratamiento térmico como forma de conservar la madera frente a la actividad de Basidiomycetes de la podredumbre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron dos especies de Basidiomycetes de la podredumbre que son frecuentemente encontradas en Uruguay colonizando madera, tanto en bosques de latifoliadas como de coníferas, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd MVHC 6727, productor de podredumbre blanca y *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill MVHC 5154, productor de podredumbre castaña, ambos pertenecientes a la colección de la Sección Micología de la Facultad de Ciencias (MVHC) (figura 4.1). Estas especies son dos de las cuatro especies utilizadas en todas las pruebas estandarizadas de durabilidad de madera (EN 113) CEN 2004, (Verma *et al.* 2008).



Figura 4.1. Cuerpos fructíferos de a: *Trametes versicolor*, b: *Gloeophyllum trabeum*

Para evaluar la capacidad de colonización de tablas aserradas secas de *Pinus taeda* por parte de los hongos, se utilizaron bloques de madera de dimensiones 25 x 10 x 5 mm (LxAxH) obtenidos de las tablas aserradas, cuyas caras radial y transversal fueron selladas con pintura epoxy a fin de dejar expuesta solo la cara tangencial. El contenido de humedad de las muestras, se determinó indirectamente tomando 3 bloques que se secaron hasta llegar a peso constante para calcular un promedio del contenido de humedad que fue utilizado para corregir la masa de las muestras acondicionadas utilizadas en el estudio de la actividad degradadora de los hongos.

Los bloques fueron colocados en bolsas cerradas y se esterilizaron con irradiación γ a temperatura ambiente por 10 días de manera de alcanzar una dosis de 25 kGy, este proceso fue realizado en el Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias.

Trametes versicolor MVHC 6727 y *Gloeophyllum trabeum* MVHC 5154 se cultivaron en agar extracto de malta al 4% (40 g de extracto de malta Difco, 20 g de agar en 1L de agua destilada) y se incubaron en estufa de cultivo a 25° C durante 7 días.

Para la inoculación de los bloques con los hongos, se tomaron discos de agar de 5mm de diámetro conteniendo micelio del hongo del margen de crecimiento activo de las colonias y se colocaron dos discos equidistantes sobre las caras tangenciales de los bloques de madera. Los bloques inoculados se colocaron en cajas estériles conteniendo 100 ml de vermiculita hidratada con 40 ml de agua destilada, para mantener una humedad relativa del 65-70% (Wei *et al.* 2013). Los bloques de madera estaban separados de la vermiculita por una malla metálica a fin de evitar su contacto directo con la misma (Figura 4.2). Se colocaron 5 bloques en cada caja. Como control se incubaron 5 bloques de madera de pino sellados sin hongo en las mismas condiciones que los bloques inoculados y se incubaron en estufa a 25°C hasta la semana 27. A lo largo del período de incubación se mantuvo la humedad relativa adicionando agua destilada estéril en caso de que fuese necesario.



Figura 4.2. Metodología de inoculación de bloques con discos de agar conteniendo inóculo de los hongos.

Las cajas se incubaron en estufa a 25 °C durante, 12, 16, 20 y 27 semanas. En cada uno de esos tiempos se retiró una caja conteniendo los bloques. Estos fueron retirados, se les quitó el micelio superficial mediante cepillado, se secaron en horno a 60°C y se pesaron diariamente hasta alcanzar peso constante.

Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de cada bloque, para cada tiempo de incubación según la fórmula: $(P_i - p_f / p_i) \times 100$

donde P_i es peso inicial de los bloques antes de la incubación, P_f es el peso final después del tratamiento con los hongos y secado. La pérdida de peso fue la variable de respuesta considerada como el resultado de la actividad del hongo sobre las maderas.

Los datos resultantes de las pérdidas de peso fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza, transformando los datos con la función arcsen. Y se realizó el test Tukey para analizar las diferencias entre grupos es decir, entre la pérdida de peso registrada en los distintos tiempos de incubación. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R studio **2.15.1** (R Development Core Team **2012**)

Para evaluar la eficiencia del tratamiento térmico de la madera de pino frente al ataque de hongos se realizó un ensayo siguiendo la norma EN 113 (CEN 2004, Verma *et al.* 2008). Se utilizaron mini bloques cuyas dimensiones fueron de 5x10x30 mm (LxAxH) obtenidos de tablas de *P. taeda* modificadas térmicamente. El proceso de modificación térmica se llevó a cabo en estufa de vacío (Cole Palmer, EEUU) a 180 °C durante 3 horas a una presión de -100 kPa. Luego del tratamiento, las tablas permanecieron en la estufa en vacío hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los mini bloques fueron cortados de estas tablas modificada. Por otro lado, se utilizaron mini bloques obtenidos de tablas de pino sin modificación térmica como testigo y mini bloques obtenidos de tablas de álamo (*Populus* sp.) para evaluar la virulencia de los hongos. El contenido de humedad de las muestras previo al experimento se determinó indirectamente tomando 3 mini bloques que fueron secados hasta llegar a peso constante a fin de calcular un promedio del contenido de humedad que fue utilizado para corregir la masa de las muestras acondicionadas utilizadas en el ensayo frente a los hongos siguiendo la misma metodología y cálculos que en el caso de maderas que no fueron tratadas térmicamente.

Los mini bloques fueron esterilizados con radiación γ como se detalló en el caso de los bloques de maderas aserradas sin tratamiento térmico.

Se realizaron cultivos de los hongos *T. versicolor* y *G. trabeum* en placas de Petri conteniendo agar extracto de malta al 4% (40 g de extracto de malta Difco, 20 g de Agar /l H₂O). Una vez que el micelio cubrió toda la placa, se colocaron varillas de vidrio de 4 mm de diámetro estériles sobre el cultivo y se colocaron los bloques de madera sobre ellas para impedir el contacto de la madera con el medio de cultivo y evitar la transferencia

de humedad (Figura 4.3). Sobre las varillas se colocaron 4 bloques distribuidos paralelamente en cada placa sin que tuviesen contacto entre sí. Se realizaron 3 réplicas. En total se evaluaron 12 bloques de pino tratados térmicamente, 12 bloques de pino sin tartar (testigo) y 12 bloques de álamo para evaluar la virulencia de cada especie de hongo.

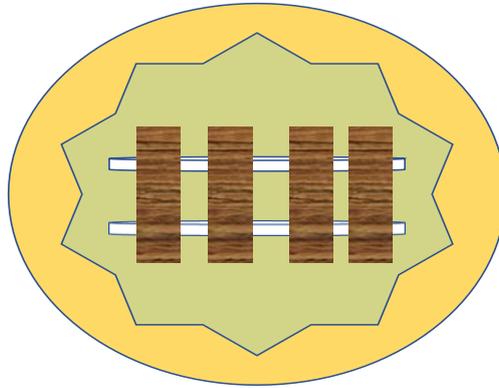


Figura 4.3. Esquema de la disposición de los bloques de madera en la placa de Petri conteniendo el micelio del hongo al que son expuestas.

Se incubaron las placas con temperatura y humedad relativa controlada, 25°C y 65%, respectivamente, durante 12 semanas. Luego de las 12 semanas, los mini bloques fueron retirados, se les quitó el micelio superficial mediante cepillado, se secaron en horno a 60°C y se pesaron diariamente hasta alcanzar peso constante. Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de cada bloque en cada tiempo de incubación según la fórmula:

$$(P_i - p_f / p_i) \times 100$$

La pérdida de peso fue la variable de respuesta considerada como el resultado de la actividad del hongo sobre las maderas.

RESULTADOS

Los bloques analizados provenientes de tablas secas sin tratamiento fueron colonizados por los hongos de ambas especies a través de las caras tangenciales. En los tres tiempos de incubación analizados, se observó una colonización superficial moderada de los

bloques que se visualizó como una capa de micelio del hongo sobre los boques. En las semanas 12, 16 y 20 el micelio desarrollado fue escaso, mientras que a la semana 27 hubo una cobertura total de las caras expuestas de los bloques por el micelio fúngico (Figura 4.4).



Figura 4.4. Bloques de pino colonizados por *G. trabeum* a las 27 semanas.

Esto se manifestó en la pérdida de peso de los bloques expuestos durante los diferentes periodos de tiempo. Las figuras 4.5 y 4.6 muestran los resultados de la pérdida de peso promedio en los diferentes tiempos de incubación para cada especie de hongo evaluado.

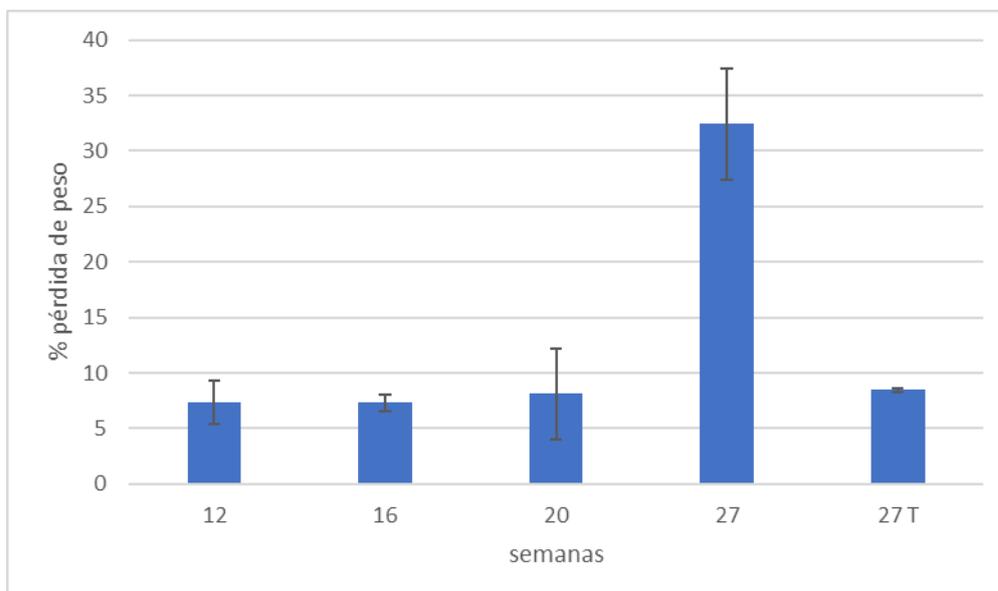


Figura 4.5. Pérdida de peso de maderas inoculadas con *G. trabeum* en los 4 tiempos estudiados y maderas testigo a 27 semanas. Las medidas son el promedio de las réplicas y las barras indican el desvío estándar.

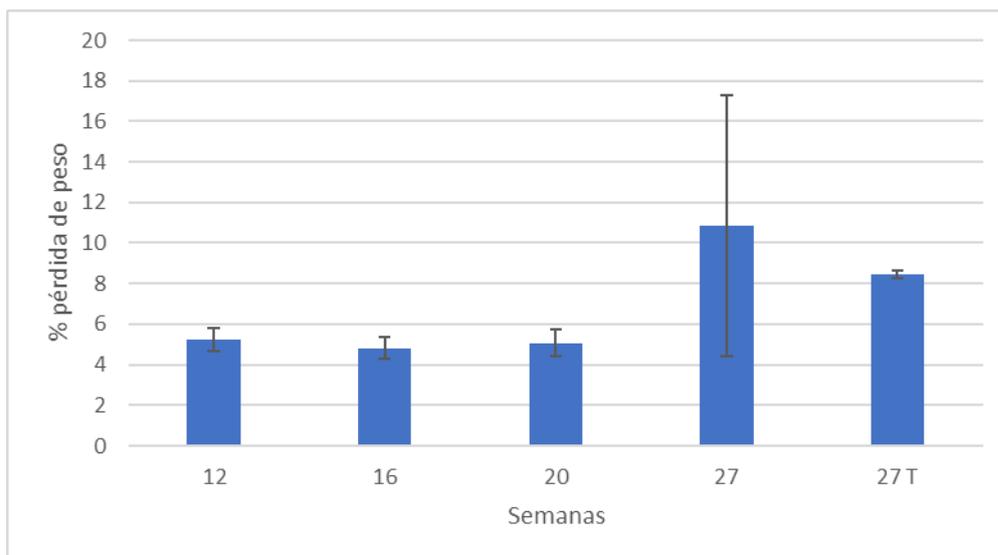


Figura 4.6. Pérdida de peso de maderas inoculadas con *T. versicolor* en los 4 tiempos estudiados y maderas testigo a 27 semanas. Las medidas son el promedio de las réplicas y las barras indican el desvío estándar.

Se observaron diferencias en la actividad de las dos especies de hongos. *G. trabeum*, hongo de la podredumbre castaña produjo una pérdida de peso promedio del 32% a las 27 semanas de inoculado, mientras que *T. versicolor* productor de podredumbre blanca solo produjo una pérdida de peso del 11% en el mismo período de incubación. En el caso del testigo (madera sin hongos inoculados), se determinó que luego de las 27 semanas hubo una pérdida de peso promedio de 8%. En cuanto a las diferencias en la pérdida de peso de los bloques incubados durante 12, 16, y 20 semanas, el análisis de varianza realizado mostró que el único tratamiento que presentó diferencias significativas fue el de las maderas inoculadas con *G. trabeum* e incubadas durante 27 semanas frente a los demás tratamientos incubados durante menos tiempo ($p < 0.05$). Si bien *T. versicolor* mostró diferencias en la pérdida de peso a las 27 semanas, con respecto a los otros tiempos de incubación, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la durabilidad de madera de pino tratada térmicamente frente a hongos de la podredumbre, se observó que para el caso de *G. trabeum* los mini bloques de madera de pino sin modificación térmica (referencia) fueron colonizados rápidamente por el micelio del hongo (Figura 4.7), provocando una pérdida de peso del 33 % a las 12 semanas de incubación.

En el caso de los mini bloques de madera tratada térmicamente hubo colonización de *G. trabeum*, con una pérdida de peso del 12%.

La madera de álamo utilizada para evaluar la virulencia, tuvo una pérdida de peso promedio de 11% observándose un escaso desarrollo de micelio superficial sobre estas maderas, como es esperable por tratarse de una latifoliada (Figura 4.8).

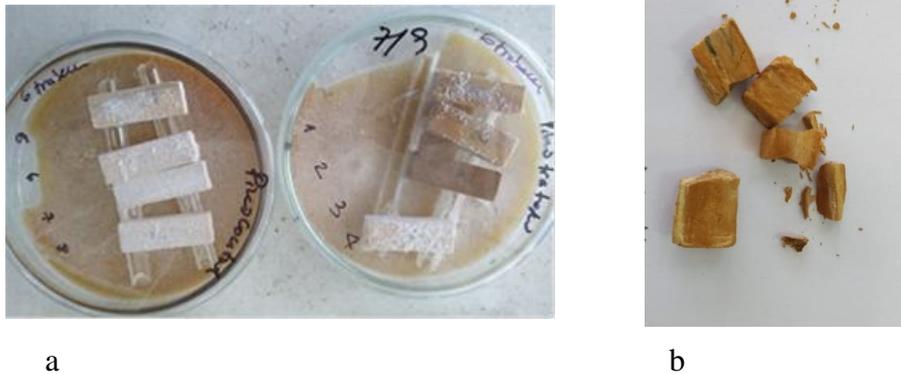


Figura 4.7 a) Minibloques de pino sin tratar (izquierda) y tratados térmicamente (derecha) colonizados por *G. trabeum* b) detalle de minibloques de pino sin tratar degradados

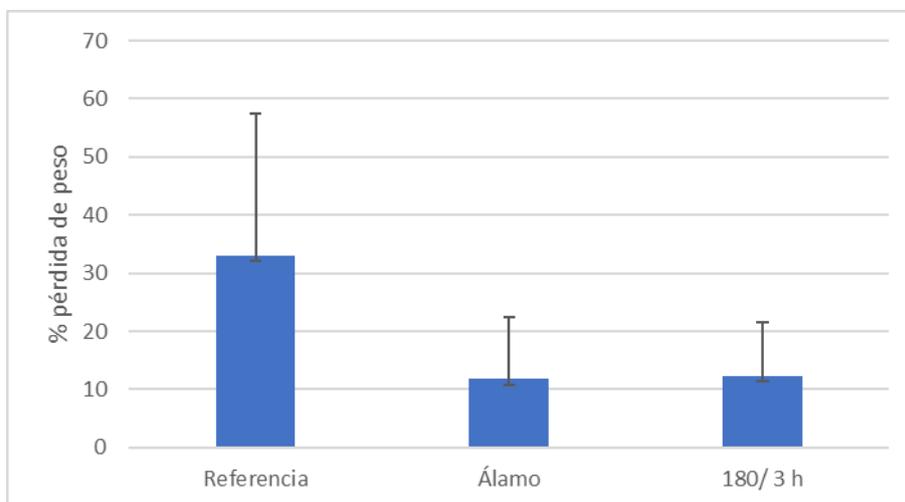


Figura 4.8. Pérdida de peso de maderas de pino sin tratar (referencia), madera tratada térmicamente (180°/3h) y de álamo luego de 12 semanas de incubación frente a *G. trabeum*. Las medidas son el promedio de las réplicas y las barras indican el desvío estándar.

Para *T. versicolor*, se observó que el micelio creció superficialmente sobre las maderas de pino tanto sin tratar (testigo), como en las tratadas térmicamente (Figura 4.9), sin embargo no hubo actividad degradadora expresada en la pérdida de peso (1% testigo y 3% tratada térmicamente, respectivamente) (Figura 4.10). En el caso de los bloques de álamo, a las 12 semanas hubo colonización y actividad degradadora provocando una pérdida de peso del 34% confirmando la virulencia de esta especie en madera de latifoliada (Figura 4.11)



Figura 4.9 Maderas de pino tratadas térmicamente (superior) y sin tratar (inferior) frente a *T. versicolor*

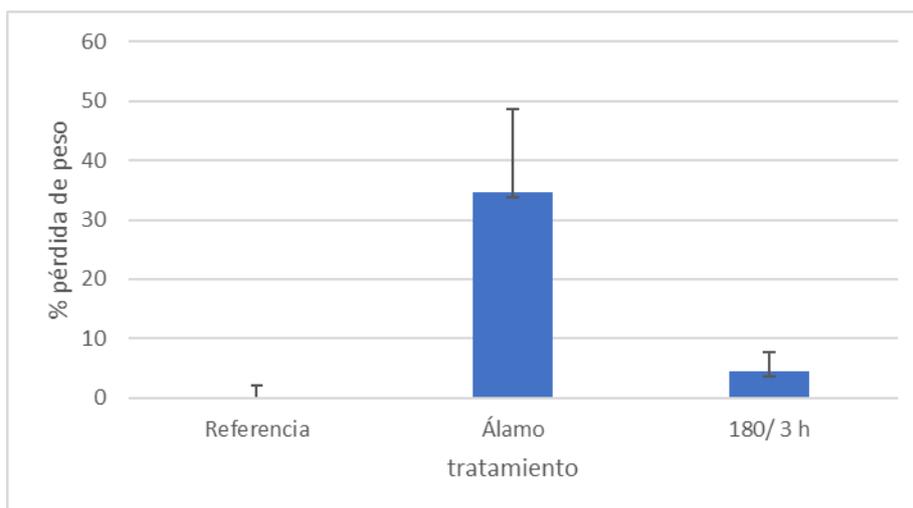


Figura 4.10. Pérdida de peso de maderas de pino sin tratar (referencia), madera tratada térmicamente (180°/3h) y madera de álamo luego de 12 semanas de incubación frente a *T. versicolor*. Las medidas son el promedio de las réplicas y las barras indican el desvío estándar.

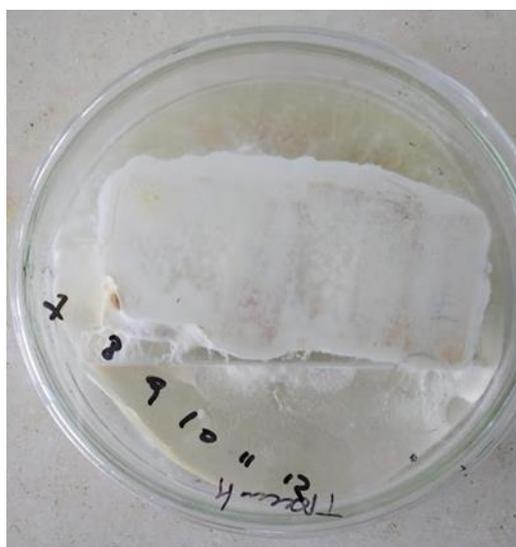


Figura 4.11. Maderas de álamo colonizadas por *T. versicolor*

No se observaron diferencias significativas entre la referencia (madera de pino sin modificar) y la madera modificada frente a *T. versicolor*.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, es evidente que las tablas secas de *Pinus taeda* sin tratamiento han sido susceptibles de ser colonizadas a través de las caras tangenciales generalmente expuestas en condiciones de uso tanto en construcciones y carpintería. Este hecho permite suponer que la madera de pino producida en el país, dado su rápido crecimiento, presenta una baja durabilidad natural en tanto pueden ser degradadas rápidamente por hongos de la podredumbre. Se observó que madera seca de *P. taeda* puede ser colonizada con hongos xilófagos si la HR (humedad relativa ambiente) es mayor o igual al 70%. Esto indica la alta susceptibilidad que tiene esta madera a la colonización por hongos. Desde el punto de vista técnico, es una señal de que la madera de *P. taeda* sin tratamiento debe utilizarse en ambientes secos para garantizar su durabilidad.

De las especies que se han inoculado experimentalmente, *G. trabeum* resultó ser más agresiva que *T. versicolor*, consistentemente con lo que ocurre en la naturaleza, donde los hongos de la podredumbre castaña son los agentes más importantes involucrados en la biodegradación de madera en ecosistemas de coníferas (Arantes & Goodell 2014). Ambas especies, sin embargo, mostraron virulencia, como lo muestra la pérdida de peso de las probetas de álamo, frente a *T. versicolor*.

En el proceso de degradación por *G. trabeum* pese a que en las primeras semanas la pérdida de peso no fue significativa, alcanzaba en la semana 27, un 33% de pérdida de peso. Es probable, que en las etapas tempranas la actividad degradadora de *G. trabeum* no se manifieste a través de la pérdida de peso mientras que pudo haber pérdida de ciertas propiedades mecánicas. Se ha demostrado que al comienzo de la actividad degradadora de los hongos productores de podredumbre castaña se puede producir la pérdida de hasta un 70% en las propiedades mecánicas como la elasticidad y ruptura de la madera. Curling *et al.* 2002, encontraron que la pérdida de masa provocada por *G. trabeum* fue indetectable hasta que la pérdida en el módulo resistencia alcanzó un 40%. Esto se ha atribuido a una extensiva despolimerización de la celulosa con un limitado metabolismo de la glucosa. Winandy & Morrell (1993) han demostrado que la pérdida de hemicelulosa en etapas tempranas de la colonización también se correlaciona con pérdidas de las propiedades mecánicas de la madera.

Si bien las maderas de pino inoculadas con *T. versicolor*, presentaron un comportamiento temporal en la pérdida de peso similar al de las inoculadas con *G. trabeum*, la pérdida de peso a la semana 27 fue solo del 11%. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en estudios realizados con madera de *Pinus sylvestris* y bambú bajo las mismas condiciones en que se efectuó este estudio, donde el hongo de podredumbre castaña *Coniophora puteana* produjo pérdida de peso del 50 % luego de 32 semanas de inoculado mientras que *Schizophyllum commune*, de la podredumbre blanca, no tuvo efecto sobre estas maderas (Wei *et al.* 2013). Nuestro resultado también es consistente con lo descrito por Curling *et al.* (2002), sobre la evaluación del efecto de la inoculación de *G. trabeum*, *Oligoporus placentus* (*Poria placenta*) y *T. versicolor*, con diferentes métodos, en maderas secas de *Pinus* spp. Así, las maderas expuestas a los hongos de la podredumbre castaña perdieron considerablemente más peso después de 12 semanas en todas las condiciones analizadas respecto a los de la podredumbre blanca. En cuanto al pérdida de resistencia, observaron que hubo el mismo comportamiento que con la pérdida de peso, en tanto en el caso de la

resistencia, se puede observar antes en el tiempo, detectándose entre el 60-80% de pérdida de resistencia solo a las 6 semanas de inoculadas (Curling *et al.* 2002).

Contrariamente al comportamiento de *T. versicolor* en madera de pino, la capacidad de degradación de madera de *Eucalyptus* por esta especie fúngica, como por otras de la podredumbre blanca evaluadas han mostrado producir pérdidas de peso algo variables, existiendo diferencias significativas entre distintas cepas (Bettucci *et al.* 1992, Bettucci *et al.* 1998). En un estudio sobre maderas tratadas térmicamente de *E. grandis*, se observó que *T. versicolor* colonizó la madera sin tratar produciendo una pérdida de peso del 23% mientras que el tratamiento térmico produjo una protección contra el ataque del hongo con solo el 2% de pérdida de peso (Alonso *et al.* 2017).

Probablemente la diferencia en la actividad degradadora de *T. versicolor* en maderas de coníferas, en relación con las de latifoliadas, se deba a las diferencias en la composición de la lignina, las maderas de especies de latifoliadas contienen niveles más altos de lignina de tipo siringil mientras que la lignina de coníferas está constituida por unidades guaiacil derivados del coniferil alcohol, siendo este tipo de lignina más resistente a la degradación por hongos de la podredumbre blanca (Highley 1982).

El tratamiento térmico evaluado en este trabajo (180° durante 3h) mostró ser efectivo para aumentar la durabilidad de las maderas frente a *G. trabeum*, la pérdida de peso se redujo de 33% al 11% en la madera de pino tratado térmicamente a pesar de que este último valor aún es alto. Se trata de un tratamiento leve, de baja temperatura, ya que la temperatura habitual para la modificación térmica de madera se realiza a temperaturas entre 200 y 250°C (Hill 2007). De esta forma, se verificó que es suficiente con alterar ligeramente la composición de la pared celular para limitar la acción degradadora de *G. trabeum*. El desvío estándar encontrado en la pérdida de peso entre los mini bloques expuestos en las mismas condiciones es semejante al encontrado en evaluaciones similares para otras especies de pino (Sivrikaya *et al.* 2015). Probablemente la heterogeneidad resultante en la anatomía, la transformación y redistribución de componentes químicos en cada muestra de madera, como resultado del tratamiento térmico explica dicha variación (Esteves & Pereira 2016). Numerosos estudios han mostrado que el tratamiento térmico conduce a una mejora en la resistencia contra muchos agentes biológicos de biodegradación aumentando la resistencia a las podredumbres de varios tipos de maderas y frente a varias especies de hongos de podredumbre. Dirol & Guyonnet (1993), estudiaron el tratamiento térmico en maderas de abeto y álamo en procesos térmicos a temperaturas entre 200 °C y 260 °C para evaluar la resistencia a la

podredumbre por *T. veriscolor*, *G. trabeum* y *C. puteana*. Estos autores encontraron menos del 1% en la pérdida de peso para las maderas tratadas térmicamente mientras que en las no tratadas era de más de 40%. Weiland & Guyonnet (2003) registraron una pérdida de peso de 22,92% y 5,94% en madera de haya sin y con tratamiento respectivamente a 230 y 260 °C cuando la madera era expuesta a *Poria placenta*. Por otra parte, Rapp & Sailer (2000), vieron que la resistencia de la madera de abeto y pino tratada térmicamente frente a *C. puteana* se alcanzaba a una temperatura de 220 °C, pero no a 180°C y ni a 200 °C, mientras que en las maderas sin tratar se producían pérdidas de peso de 48% en abeto y 40% en pino. En todos estos casos, las maderas modificadas térmicamente a temperaturas más altas parecen tener mayor resistencia a las podredumbres. Sin embargo, la mayor temperatura de tratamiento provoca una degradación de las propiedades mecánicas de las piezas, por lo que deberían considerarse, según el uso, las pautas a seguir.

Cabe preguntarse cuáles son las propiedades de la madera térmicamente tratada que han limitado el desarrollo y la capacidad de degradación.

Como resultado del tratamiento térmico por encima de los 180°C y no más de 250°C la madera tiene importantes transformaciones químicas. Las hemicelulosas son los primeros compuestos estructurales que se modifican incrementando la descomposición de los polisacáridos. El contenido de pentosanos de madera de pino tratada por 7 horas a 130°C descendió de 11 a 9% (Potutkin & Shirayena 1975). Las hemicelulosas sufren reacciones de deshidratación con un descenso en los grupos hidroxilos (Weiland & Guyonnet 2003). Este descenso de carbohidratos depende del tipo de tratamiento y del tipo de madera, por ejemplo, es mayor para *Betula pendula* que para *Pinus sylvestris* (Zaman *et al.* 2000). La celulosa es menos afectada que la hemicelulosa probablemente por su estructura cristalina. Bourgois y Guyonnet (1988) encontraron que el tratamiento de madera de pino a 260° no alteraba la celulosa significativamente. La cristalinidad de la celulosa se incrementa debido a la degradación de la celulosa amorfa, disminuyendo la accesibilidad a las moléculas de agua por los grupos hidroxilos que contribuyen a un descenso en el equilibrio del contenido de humedad (Wikberg & Maunu 2004, Boonstra *et al.* 2006). En cuanto al contenido de lignina se ha observado que el tratamiento térmico incrementa su porcentaje. La mayoría de los extractivos de la madera también se degradan durante el tratamiento térmico al tiempo que se forman nuevos.

Otra propiedad de la madera que se modifica con este tipo de tratamiento es la reducción en el contenido de humedad, en el punto de equilibrio, lo que conduce a que se produzca

un mejoramiento en la estabilidad dimensional, fundamentalmente debido a un descenso en la higroscopicidad como resultado de los cambios químicos. Esta estabilidad dimensional puede ser el resultado de la formación de polímeros de azúcares que son menos higroscópicos que las hemicelulosas de las que derivaron (Dirol & Guyonnet 1993).

En síntesis, de acuerdo con Weiland & Guyonnet (2003), la madera tratada térmicamente es más resistente a las podredumbres por hongos debido a que las moléculas que resultan del tratamiento, como furfural, pueden reticularse con la lignina de modo que las enzimas de los hongos no reconocen el sustrato y por lo tanto no lo degradan. Así mismo, la madera tratada con calor tiene un punto de saturación de la fibras más bajo que las no tratadas debido al descenso en el equilibrio del contenido de humedad que conduciría a una mejor resistencia a la biodegradación. Asociado a este hecho, ocurre la transformación de las hemicelulosas que cambian de hidrofílicas y digeribles a moléculas hidrofóbicas.

Por otra parte, la variabilidad en la efectividad invasiva y degradadora de las cepas fúngicas, en relación al aumento de la resistencia a los tratamientos térmicos, depende de la temperatura del tratamiento, en menor medida de la duración del tratamiento y menos aún de la interacción entre los factores temperatura y duración (Esteves & Pereyra 2016). Por lo antes expuesto, las tablas aserradas de pino producidas localmente presentarían baja durabilidad frente a la presencia de hongos degradadores. Estas tablas sin tratamiento adicional pueden ser rápidamente colonizadas y deterioradas, debido a que en nuestro país las condiciones de humedad y temperaturas prevalentes son las favorables para la colonización y las especies evaluadas en este ensayo son frecuentemente encontradas en los bosques en nuestro país, por lo que el inóculo para efectuar la infección está ampliamente distribuido. Lo más relevante es que la aplicación del tratamiento térmico es una alternativa para brindar mayor durabilidad que no resulta contaminante del medio ambiente como los tratamientos químicos utilizados habitualmente. Las maderas de pino producidas localmente tratadas térmicamente, evaluadas en este trabajo, como de *Eucalyptus grandis*, que han mostrado capacidad de resistir la actividad degradadora de hongos de la podredumbre blanca (Cantera *et al.* 2021) podrían constituir un insumo renovable, con numerosas condiciones favorables para ser utilizadas en la construcción tal como la capacidad de aislamiento térmico y fácil mantenimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso R, Lupo S, Dieste A, Martinez J & Bettucci L (2017). Maderas tratadas térmicamente: resistencia a la degradación por Basidiomycetes. Congreso Latinoamericano de Micología. Lima. Perú.

Arantes V & Goodell B (2014). Current Understanding of Brown-Rot Fungal Biodegradation Mechanisms: A Review. In: Schultz et al. (eds.). ACS Symposium Series Vol. 1158. American Chemical Society. Washington DC. pp 3-21.

Bagley S & Richter DL (2002). Biodegradation by brown rot fungi. In: Osiewicz HS (ed.). *The Mycota*. Springer. Heidelberg. pp. 327-340.

Barnes HM & Murphy RJ (1995). Wood preservation. The classics and the new age. *Forest Products Journal* 45: 16-23.

Bettucci L, Speranza M & Piaggio M (1992). Selection of White rot fungi for biopulping. *Proceedings of the Second Brazilian Symposium on the chemistry of lignins and others wood components*. Vol. III, pp. 394-401.

Bettucci L, Speranza M, Piaggio M, Siñeris F & Breccia J (1998). Degradation of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* by several white rot fungi isolated in South America. *Material und Organismen* 32: 227-233.

Blanchette RA (1991). Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review Phytopathology* 29: 381-398.

Boonstra M, Rijdsdijk J, Sander C, Kegel E, Tjeerdsma B, Militz H, Van Acker J & Stevens M (2006). Physical aspects of heat-treated wood. Part 1. Softwoods. *Maderas: Ciencia y Tecnología* 8: 193-208.

Boscana M, Boragno L & Echevarría R (2016). *Estadísticas forestales 2016*. Dirección General Forestal. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Montevideo.

Bourgois J & Guyonnet R (1988). Characterisation and analysis of torrefied wood. *Wood Sci. Technol.* 22: 143-155.

Cagno M, Cardoso A, Gatto F & O'Neill H (2013). Physical and Mechanical Properties of Loblolly and Slash Pine Wood from Uruguayan Plantations. *Forest Products Journal* 63: 128-137.

Cantera L, Alonso R, Lupo S, Bettucci L, Amilivia A, Martínez J & Dieste A (2021). Durability of thermally modified *Eucalyptus grandis* wood against wild strains. *Wood Material Science and Engineering* doi.org/10.1080/17480272.2021.1892185.

Clark A & Saucier J R (1989). Influence of initial planting density, geographic location, and species on juvenile wood formation in southern pine. *Forest Prod. J.* 39: 42-48.

Cubbage F, Koesbandana S, Mac Donagh P, Rubilar R, Balmelli G, Morales Olmos V, De La Torre R, Murara M, Hoeflich VA, Kotze H, Gonzalez R, Carrero O, Frey G, Adams T, Jurnerjk, Lord R, Huang J, Mac Intyre Ch, McGinley K, Abt R, Phillips R (2010). Global timber investments, wood costs, regulation, and risk. *Biomass and Bioenergy* 34: 1667-1678.

Curling S, Clausen CA & Winandy JE (2002). Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 49: 13-19.

Daniel G (2016). Fungal Degradation of Wood Cell Walls. In: *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, and Applications*. Academic Press: Yoon Soo K, Ryo F &, Adya P (eds.). Singh. pp.131-169.

Dieste A (2014). Mitigación del impacto ambiental de madera tratada químicamente. Dirección Nacional de Industrias. Ministerio de Industrias, Energía y Minería, Montevideo.

Dirol D & Guyonnet R (1993). The improvement of wood durability by retification process. International research groups on wood preservation. IRG/WP 93-40015, Section 4. 24 Annual meeting, May 16-21 Orlando.

Eaton R A & Hale MD (1993). *Wood: Decay, pests, and protection*. Chapman and Hall. London. 520p.

Elaieb K, Candelier A, Pétrissans S, Dumarçay P & Gérardin Pétrissans M (2015). Heat treatment of tunisian soft wood species: effect on the durability, chemical modifications and mechanical properties. *Maderas. Ciencia y Tecnología* 17: 699-710.

EN 113/A1 Standard (2004). Produits de préservation du bois. Méthode d'essai pour déterminer l'efficacité protectrice vis-à-vis des champignons basidiomycètes lignivores. Détermination du seuil d'efficacité. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. 632p.

Eriksson KEL, Blanchette RA & Ander P (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer Verlag. Berlin. New York. 407pp.

Esteves B M & Pereira HM (2016). Wood modification by heat treatment: Review. *BioResources* 4: 370-404.

European Committee for Standardization (1997). Round and sawn timber. Method of measurement of features. In 1310. CEN, Brussels.

European Committee for Standardization (1996). Wood preservatives method of test for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes, determination of the toxic values. In 113. CEN, Brussels.

Gabinete Productivo (2012). Plan sectorial forestal-madera. Planes industriales. Fase I. Parte 2. Forestry and wood sector. Industry plans. Phase I. Part 2. <http://gp.gub.uy/es/documentos>.

Gilbertson R (1980). Wood-Rotting Fungi of North America. *Mycologia* 72:1-49.

Griffin DM (1977). Water potential and wood decay fungi. *Ann.Rev. Phytopathol.* 15: 319-329.

Highley TL (1982). Influence of type and amount of lignin on decay by *Coriolus versicolor*. *Can. J. For Res.* 12: 435-438.

Hill CA (2007). Wood Modification: Chemical, Thermal and Other Processes Vol. 5. John Wiley & Sons. Hoboken.

Hingston JA, Collins CD, Murphy RJ & Lester JN. (2001). Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: A review. *Environ Pollut.* 111: 53-66

Jane FW (1956), The structure of wood. Adam and Charles Black. London.

Liese W (1970). Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8: 231-257.

Martinez Kopp S (2014). Comunidades de Basidiomycetes lignícolas en bosques nativos de Uruguay y factores que condicionan su composición. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. PEDECIBA.UDELAR.

Militz H & Altgen M (2014). Processes and properties of thermally modified wood manufactured in Europe. In: Schultz TP (ed.). *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*. Washington D.C. American Chemical Society. pp. 269-285.

MGAP (2018). Anuario estadístico de DIEA. Montevideo, Uruguay.

Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) (2011). Sistemas constructivos no tradicionales [Nontraditional construction systems for residential buildings]. <http://www.mvotma.gub.uy/tu-vivienda/construir/sistemas-constructivos-notradicionales>.

Monrroy M, Ortega I, Ramírez M, Baeza J & Freer J (2011). Structural Change in Wood by Brown Rot Fungi and Effect on Enzymatic Hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol* 49: 472-477.

Morales V (2007). The economic impact of the forest sector in Uruguay. Master's Thesis. University of Georgia. Athens. 158 pp.

Moura LF, Brito JO & Silva Júnior FG (2012). Effect of thermal treatment on the chemical characteristics of wood from *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden under different atmospheric conditions. *Cerne* 18: 449-455.

Moya L, Laguarda-Mallo L, Cagno M, Cardoso A, Gatto F & O'Neill H (2013). Physical and Mechanical Properties of Loblolly and Slash Pine Wood from Uruguayan Plantations *Forest Products Journal* 63: 129-137.

Panshin AJ & Zeeuw C (1970). Textbook of wood technology. Volume I. Structure, identification, uses, and properties of the commercial woods of the United States and Canada. Mac Graw-Hill College New York. 391p.

Peralta R, Polacchineda B, Silva R, Carvalho G, Côrrea C, Kato F, Seixas VA & Bracht SA (2017). Enzymes from Basidiomycetes. Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press. Minnesota. pp 185-192.

Poncsak S, Kocaefe D, Bouazara M &, Pichette A (2006). Effect of high temperature treatment on the mechanical properties of birch. *Wood Sci. Technol.* 40: 647-668.

Potutkin G & Shirayena L (1975). Changes in chemical components of wood during high temperature drying. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Lesn. Zh* 18: 127-129.

R studio 2.15.1 (R Development Core Team (2012).

Ramos A & Cabrera R (2001). Uruguay Forest Sector Impact. Forest Producers Society. Montevideo. Uruguay. 99 pp.

Rapp OA & Saile MF (2000). Oil-heat-treatment of wood. Process and properties. *Drvna Industrija* 52: 63-70.

Schwarze FWMR, Engels J & Mattheck C (2000). Fungal Strategies of wood decay in trees. SpringerVerlag. Berlin. Heidelberg. 204pp

Sivrikaya H, Ahmet Can A, de Troya T & Conde M (2015). Comparative biological resistance of differently thermal modified wood species against decay fungi. *Maderas: Ciencia y Tecnologia* 17: 559-590.

Verma P, Dyckmans J, Militz H & Mai C (2008). Determination of fungal activity in modified wood by means of micro-calorimetry and determination of total esterase activity. *Applied Microbial and Cell Physiology*. Volume 80, 125.

Wei D, Schmidt O & Liese W (2013). Method to test fungal degradation of bamboo and wood using vermiculite as reservoir for moisture and nutrients. *Maderas: Ciencia y Tecnologia* 15: (3).

Weiland JJ & Guyonnet R (2003). Study of chemical modifications and fungi degradation of thermally-modified wood using DRIFT spectroscopy. *Holz Roh-Werkst* 61: 216-220.

Wikberg H & Maunu S (2004). Characterisation of thermally modified hard and softwoods by ¹³C CPDAS NMR. *Carbohydr Polym*. 58: 461-466.

Wilcox WW, Parameswaran N & Liese W (1974). Ultrastructure of Brown Rot in Wood Treated with Pentachlorophenol. *Holzforschung* 28: 211-217.

Windeisen E & Wegener G (2008). Chemical Characterization and Comparison of Thermally Treated Beech and Ash Wood. *Materials Science Forum* 599: 143-158.

Winandy JE & Morrell JJ (1993). Relationship between incipient decay, strength, and chemical composition of Douglas-fir heartwood. *Wood and Fiber Science* 25: 278-288.

Zaman A, Alen R & Kotilainen R (2000). Heat behavior of *Pinus sylvestris* and *Betula pendula* at 200-230°C. *Wood Fiber Science* 32: 138-143.

Conclusiones generales

Algunos de los resultados de las investigaciones que se encuentran expuestos en los capítulos de esta tesis, me reforzaron algunas ideas y me han planteado algunas nuevas preguntas sobre otras.

A veces ocurre en los ecosistemas de plantaciones con especies exóticas, que los hongos habitualmente asociados a esas especies en su lugar de origen están ausentes. En el presente estudio se encontró que muchas de las especies endófitas de pino son también colonizadoras de algunas Angiospermas estudiadas en Uruguay. Este hecho sugiere que los hongos endófitos en plantaciones exóticas de pino podrían provenir del inóculo presente en plantas nativas o Angiospermas exóticas extensamente plantadas en el país dada la ausencia de coníferas nativas, siendo las más próximas las araucarias del sur de Brasil.

Cabe considerar, al mismo tiempo, que el taxa más frecuente en las plantaciones de más de 8 años fue *Lophodermium*, típico colonizador de coníferas y ausente en especies de angiospermas. Las especies de este género encontradas en este estudio no revisten importancia fitopatológica y son importantes descomponedoras de mantillo, lo que asegura el rápido reciclaje de nutrientes. Por otra parte, competirían por el nicho con especies cogenéricas patógenas.

El patógeno *Fusarium circinatum*, causante del cancro resinoso del pino, fue detectado tempranamente en el país y las medidas adoptadas para evitar su propagación fueron exitosas, demostrado por la ausencia de este en plantaciones. Por otra parte, en base al diferente comportamiento de las distintas cepas obtenidas y evaluadas en experimentos de inoculación artificial, se puede asumir la presencia de una población heterogénea en las semillas introducidas para la producción de plántulas.

En el estudio de los hongos productores de mancha azul asociados a escolítidos, apareció en el horizonte una compleja comunidad de microorganismos constituida por numerosos taxa que se benefician en su nutrición como también se benefician los hongos en su dispersión y adquisición de nuevos recursos. Este trabajo constituye el primer estudio de hongos manchadores de la madera en Uruguay. Se identificaron cuatro especies de hongos Ophiostomatales asociados a los escarabajos de la corteza, siendo *Ophiostoma ips* la especie predominante. Como se mencionó, en las plantaciones de pinos en Uruguay, a la fecha, los principales problemas sanitarios lo constituyen los insectos plaga, y de ellos, los escarabajos de la corteza han tenido gran impacto. Dada la íntima relación que ellos establecen con hongos fue importante detectar e identificar la presencia de hongos manchadores como un avance en el conocimiento de un problema que afecta la calidad de la madera y su valor en la comercialización. Las especies identificadas, son típicamente manchadores y han sido registradas asociadas a las especies de escarabajos estudiados en numerosos países. Es de suponer que la introducción de estas se produjo con la introducción de los insectos vectores.

Ahora bien, merece la atención la evaluación de la actividad que desempeñan los hongos descomponedores sobre la madera de pino producida en el país. Sin tratamiento adicional esta madera blanda puede ser colonizada rápidamente y deteriorada por actividad de los hongos degradadores de recursos lignocelulósicos frecuentemente encontrados en el país. El tratamiento térmico, una tecnología limpia como alternativa a tratamientos altamente contaminantes, mostró brindar mayor durabilidad a la madera frente al ataque de hongos de la podredumbre castaña. Las especies evaluadas en este trabajo son frecuentemente encontradas en los bosques en nuestro país, por lo que el inóculo para efectuar la infección y degradación de estas maderas está ampliamente distribuido.

Para finalizar y volviendo al marco introductorio general los hongos constituyen un grupo de organismos con variadas relaciones con las plantas y otros organismos, que hacen posible que exista un reciclaje de recursos para el mantenimiento del ecosistema y el equilibrio de sus poblaciones.

First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay

R. Alonso^{A,B} and L. Bettucci^A

^ALaboratorio de Micología Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, Universidad de la República Montevideo, Uruguay.

^BCorresponding author. Email: raquela@fing.edu.uy

Abstract. In recent years *Pinus* spp. plantations have become an important resource that is continuously increasing in Uruguay as well as in other countries. Fungal diseases in nurseries are common, and among them, *Fusarium circinatum* (the pitch canker fungus) was found associated with *Pinus taeda* seedling, representing the first record of this pathogen in Uruguay.

The pitch canker fungus *Fusarium circinatum* (Nirenberg and O'Donnell 1998) is a destructive pathogen that affects several *Pinus* species. Although the main symptom most frequently associated with this pathogen is the presence of large resinous cankers on the main trunk and lateral branches of trees, it can also be associated with roots, shoots, cones and seedlings (Barnard and Blakeslee 1980; Viljoen *et al.* 1994). This disease has been detected in south-eastern USA (Kuhlman *et al.* 1982), Mexico (Guerra-Santos 1999), South Africa (Viljoen *et al.* 1994), Chile (Wingfield *et al.* 2002), Spain (Pérez-Sierra *et al.* 2007) and other countries (Wingfield *et al.* 2008).

In Uruguay, forest plantation activity has increased over the last 20 years and the main exotic species planted are *Eucalyptus* spp. and *Pinus* spp. (Petraglia and Dell'Acqua 2006).

Nursery diseases are common and most of them are related to fungal pathogens. Recently, a symptom associated with *Pinus taeda* seedlings was observed. Needles of affected seedlings showed different stages of chlorosis ranging from pale green to reddish-brown discolouration. Stem and collar rot with bark cracks were detected and in some of them fungal sporodochia were observed (Fig. 1).

For the isolation of fungi associated with the stem lesions, segments of stems were placed in a moist chamber to stimulate mycelial development and also segments of affected tissues were surface disinfected (80% ethanol for 1 min and 2% sodium hypochlorite solution for 2 min) rinsed with sterile distilled water and placed in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). From colonies belonging to *Fusarium* sp. single-conidium transfers were made to obtain pure cultures on PDA and Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) media allowing the identification to species level (Leslie and Summerrell 2006). Micromorphological characteristics, such as the presence of simple and proliferating conidiophores with polyphialides, microconidia in false heads, macroconidial shape, absence of chlamydoconidia and the typical sterile coiled hyphae (Fig. 2), led to the identification of *Fusarium circinatum* (Nirenberg and O'Donnell 1998; Britz *et al.* 2002). Molecular methods



Fig. 1. Stem bark crack showing fungal sporodochia ($\times 30$).

were also performed to verify the identification. DNA was obtained from fresh aerial mycelia by extraction with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), followed by organic extraction and isopropanol precipitation of the DNA using the method described by Lee and Taylor (1990). The intergenic spacer (IGS) region was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the CIRC1A and CIRC4A species-specific primers (Schweigkofler *et al.* 2004). The amplicons were separated by electrophoresis in agarose gel (2%), stained with ethidium bromide (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), and visualised and photographed under ultraviolet light. The amplicon corresponded to the 360-bp fragment in accordance with those predicted for *F. circinatum*.

This is the first report of the presence of this pathogen in nurseries of *Pinus taeda* in Uruguay. This exotic pathogen was probably introduced with seeds since in field plantations symptoms have not yet been observed. On the other hand, a significant volume of *Pinus* timbers is not frequently imported.



Fig. 2. Coiled hypha and macroconidia of *Fusarium circinatum* ($\times 400$).

Although the incidence in nurseries is low, the control and eradication of affected seedlings is very important in order to avoid the expansion of the pathogen into the field. Since other *Fusarium* species are very frequently found affecting several crops in Uruguay due to the cool and humid climatic conditions that favour the development of these fungi, monitoring of this disease has become necessary.

On the other hand, although some practices for disease control may include seedling destruction, application of chemical products or biological control agents (Mitchell *et al.* 2004), the best way to reduce the disease incidence seems to be the selection of plant-resistant genotypes to *F. circinatum*.

References

- Barnard EL, Blakeslee GM (1980) Pitch canker of slash pine seedlings: a new disease in forest tree nurseries. *Plant Disease* **64**, 695–696.
- Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO (2002) Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* **54**, 9–22.
- Guerra-Santos JJ (1999) Pitch canker on Monterrey pine in Mexico. In 'Forestry and Forest Products. Current and Potential Impacts of Pitch Canker in Radiata Pine. Technical report Vol. 112'. (Eds ME Devey, Matheson AC, Gordon TR). pp. 58–61. (CSIRO: Canberra)
- Kuhlman EG, Dianis SD, Smith TK (1982) Epidemiology of pitch canker disease in Loblolly-pine seed orchard in North Carolina. *Phytopathology* **72**, 1212–1216. doi: 10.1094/Phyto-72-1212
- Lee S, Taylor J (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In 'PCR protocols: a guide to methods and applications'. (Eds MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White). pp. 82–287 (Academic Press: San Diego, California, USA)
- Leslie JF, Summerrell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa.
- Mitchell RG, Zwolinski J, Jones NB, Coutinho T (2004) The effect of applying prophylactic measures on the post-planting survival of *Pinus patula* in South Africa. *Journal of Forest Science* **200**, 51–58.
- Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**, 434–458. doi: 10.2307/3761403
- Peréz-Sierra A, Landeras E, Leon M, Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J (2007) Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* **111**, 832–839. doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.009
- Petraglia C, Dell'Acqua M (2006) Actualización de la cartografía forestal del Uruguay con imágenes del año 2004. *XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto* (pp. 1801–1808). Florianópolis, Brasil.
- 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**, 3512–3520. doi: 10.1128/AEM.70.6.3512-3520.2004
- Viljoen A, Wingfield MJ, Marasas WFO (1994) First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on seedlings in South Africa. *Plant Disease* **78**, 309–312.
- Wingfield MJ, Jacobs A, Coutinho TA, Ahumada R, Wingfield BD (2002) First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant Pathology* **51**, 397. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00710.x
- Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, Coutinho TA (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forest worldwide. *Australasian Plant Pathology* **37**, 319–334. doi: 10.1071/AP08036

Manuscript received 20 August 2009, accepted 26 August 2009