

Caracterización morfológica de *Acremonium* sp. asociado a *Neonectria fuckeliana* en *Pinus radiata* en Chile

(Morphological characterization of *Acremonium*-like associated with *Neonectria fuckeliana* in *Pinus radiata* in Chile)

Eduardo Molina, R ^{1*}. Rodrigo Morales, R ¹. Eduardo Valenzuela, F ². Isabel Vives, G ¹.

¹ Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Instituto de Silvicultura, Laboratorio de Patología Forestal, Valdivia, Chile, tel.: 63-293618

² Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Bioquímica y Microbiología, Valdivia, Chile.

*Autor para correspondencia: eduardo.javier.molina.rademacher@gmail.com

Recibido:10-09-12

Aprobado:20-11-12

Palabras clave: *Acremonium*, aislamientos, caracterización morfológica, *Neonectria fuckeliana*, *Pinus radiata*.
Key words: *Acremonium*, isolated, morphological characterization, *Neonectria fuckeliana*, *Pinus radiata*.

RESUMEN

En este estudio se realizaron los primeros aislamientos del estado asexual del patógeno *Neonectria fuckeliana* asociado a canchros o «revirado del pino» en plantaciones de *Pinus radiata*. Se caracterizaron morfológicamente las cepas del sinanamorfo semejante a *Verticillium (Acremonium)*, obtenidas en cultivo *in vitro* a partir de peritecios. El material para los aislamientos consistió en trozos de corteza de *P. radiata* con presencia de peritecios, colectados en Toltén, región de La Araucanía, lugar donde se realizó el primer reporte de *N. fuckeliana* en Chile. Se utilizaron diez cepas del semejante a *Acremonium* para la caracterización morfológica, mediciones de estructuras fúngicas, ritmo de crecimiento *in vitro* y morfología de las colonias. Las colonias presentaron un micelio floccoso y ralo de bordes blanquecinos e irregulares, destacándose tres tipos de colonias, blancas, naranja oscura y naranja claro. Taxonómicamente, las cepas coinciden con las estructuras mencionadas en la literatura, caracterizándose por la presencia de gliosporangios. Las fialides midieron entre 7 – 78,4 x 1,4 - 4,9 μ m. Los conidios, de formas ovoides y algunas bicelulares, midieron entre

4,2 - 8,4 x 2,6 - 3,5 μ m. El ritmo de crecimiento *in vitro* fue lento, completando su desarrollo a los 19 días con un promedio de 71 \pm 0,3 mm de diámetro, a una tasa de crecimiento diario de 3,8 mm. Los resultados obtenidos hacen necesario futuros estudios de carácter molecular para analizar la variabilidad genética poblacional que puede presentarse en Chile.

ABSTRACT

First *Neonectria fuckeliana* isolates in Chile. Strains of *Acremonium* obtained from *in vitro* perithecia culture were morphologically characterized. The samples were collected in Toltén, La Araucanía region, where *Neonectria fuckeliana* was first reported in Chile. The material used for the isolation came from pieces of *Pinus radiata* bark with perithecia. Ten *Acremonium*-like strains were used for characterization of fungal structures, *in vitro* growth and strains morphology. The colonies were a floccose mycelium and thin edges whitish and irregular, varying color highlighting three types of strains, white, dark orange and pale orange. Taxonomically, the strains match the structures referred in the literature, characterized by the presence of

gliosporos. The phialides dimensions ranged from 7 to 7.8 μm long and 1.4 to 4.9 μm wide. The conidio of ovoid shapes and some bicelular measured between 4.2 to 8.4 μm in length and width 2.6 and 3.5 μm . In vitro growth rates were slow, the complete development take 19 days with a daily growth average of 71 ± 0.3 mm in diameter, at a rate of 3.8 mm. It is necessary future molecular studies to analyze the population genetic variation that may occur in Chile.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies forestales de importancia económica en Chile, *Pinus radiata* D. Don representa el primer lugar con una superficie aproximada de 1,4 millones de hectáreas plantadas (INFOR, 2008). La presión por mantener el recurso libre de plagas y enfermedades, radica en los impactos que se pueden generar por daños de agentes bióticos produciendo la descalificación de los productos madereros a obtener o el cierre de los mercados internacionales, generando impactos directos en la economía del país.

En el año 2008 se reportó en Chile, región de La Araucanía, el patógeno *Neonectria fuckeliana* (Booth) Castl. et Rossman (sin. *Nectria fuckeliana* Booth) asociado a plantaciones de *P. radiata* podadas, causando canchros y malformaciones fustales, llamado comúnmente como «revirado del pino», por la particularidad de la sintomatología (Morales, 2009). Este hongo puede atacar plantaciones de *P. radiata* que sufran cualquier tipo de heridas o que sean podadas, ingresando a sus hospedantes a través de estas lesiones (Peace, 1962; ENSIS, 2006).

Neonectria fuckeliana pertenece a la división Ascomycota, orden Hypocreales. Como resultado de la reproducción sexual presenta cuerpos fructíferos llamados peritecios (Ver figura 1), de color rojo a marrón, estos crecen agrupados sobre la corteza de *P. radiata* en los canchros producidos por el patógeno (Morales, 2009). Este hongo presenta dos estados sinamorfos, uno corresponde a *Cylindrocarpon cylindroides* var. *tenue*. (Wollenw) y el otro semejante a *Acremonium*, el cual se ha detectado sólo en laboratorio al realizar aislamientos del patógeno (Dick et al., 2009; Chaverri et al., 2011).



Figura 1. Estructuras sexuales de *Neonectria fuckeliana*. A) Agrupaciones de peritecios en corteza de *Pinus radiata* (barra representa 1 cm). B) Peritecios bajo lupa estereoscópica (barra representa 200 μm). C) Ascosporas septadas y gutuladas (barra representa 10 μm).

El objetivo de esta investigación fue realizar las primeras descripciones de un semejante a *Acremonium* en Chile, con la finalidad de conocer sus características morfológicas en laboratorio y determinar diferencias entre cepas, obtenidas en cultivo puro, a partir de peritecios colectados en la zona de Toltén, región de La Araucanía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo

El área de estudio correspondió a una plantación de *P. radiata*, dos rodales de 6 y 7 años de edad, ubicados en un predio de la zona de Toltén, región de La Araucanía, Chile (39° 16'43" S y 73° 09'59", que presentaban una alta incidencia (80 %) de ataque por *N. fuckeliana*. La zona de Toltén se encuentra en el área de crecimiento 0-7-3 descrita por Schlatter *et al.* (1995) la que se caracteriza por tener una topografía con lomajes y cerros con suelos profundos a moderadamente profundos, los cuales son derivados de esquistos metamórficos y sedimentos marinos. El clima es de tipo templado lluvioso con influencia marina con una precipitación promedio anual de 1.994 mm, mientras que las temperaturas máxima y mínima promedio son 21 y 5 °C respectivamente (Santibañez & Uribe, 1993).

Aislamiento del estado semejante a *Acremonium*

El material utilizado para los aislamientos correspondió a pequeños trozos de corteza de *P. radiata* con canchales y presencia de peritecios de *N. fuckeliana*. Desde estos se seleccionaron fructificaciones maduras de color rojo intenso que midieron entre 300 y 400 µm de diámetro (Funk, 1981; Brayford *et al.*, 2004). El protocolo de desinfección utilizado consistió en sumergir un trozo de corteza con peritecios en una solución de alcohol 70 % por 30 segundos, luego se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 5 minutos, luego 30 segundos en alcohol 70 %, y un minuto en agua destilada estéril para retirar restos de alcohol y cloro. Los peritecios desinfectados fueron sembrados en agar extracto de malta al 2 %, al que se le adicionó 0,5 mL de una solución de antibiótico (penicilina y

estreptomocina), para evitar desarrollo de bacterias. Una vez sembrados se almacenaron en una estufa de cultivo a 23 °C por una semana (Molina, 2010).

Cada aislamiento obtenido constituyó una cepa, se obtuvieron 10 cepas, las cuales fueron replicadas para los ensayos relacionados con la fisiología y características taxónomicas del patógeno. Para cuantificar el crecimiento diametral de las colonias del semejante a *Acremonium*, las placas sembradas se llevaron a estufa de cultivo a 23 °C, y se midió el crecimiento de las colonias durante veinte días, en dos direcciones perpendiculares al centro de la colonia cada cuatro días (French & Hebert, 1980). Para determinar el ritmo de crecimiento se trabajó con los promedios de los diámetros de cada medición. La morfología y textura de las colonias se evaluaron según la descripción pictográfica propuesta por Newman *et al.* (2008), y el color se evaluó a través de la tabla Munsell (Munsell, 1971).

Para la caracterización microscópica del semejante a *Acremonium*, se utilizaron 10 cepas las que se identificaron de acuerdo a lo descrito por Domsch *et al.* (1980), a las que se les midió el largo y ancho de 50 conidios y fialides. Luego se comparó con las características descritas por Brayford *et al.* (2004).

Análisis estadísticos

Con los datos de las mediciones de conidios y fialides se aplicó un análisis de varianza entre cepas y una prueba de multicomparación de medias (Tukey) con un 95 % de confianza.

RESULTADOS

En medio de cultivo agar malta 2 % se observó el desarrollo de las colonias de semejante a *Acremonium* caracterizadas por un micelio aéreo ralo, floccoso, de bordes blancos e irregulares, de color blanco al inicio de su crecimiento (figura 2C), de las cuales el 27 % de las colonias mantuvo esta tonalidad (figura 2B), el 56 % restante presentó un color intermedio entre blanco y naranja (5YR7/6 *yellow*) (figura 2A) y el 17 % restante se tornaron de color naranja (2,5YR4/6 *dark red*).

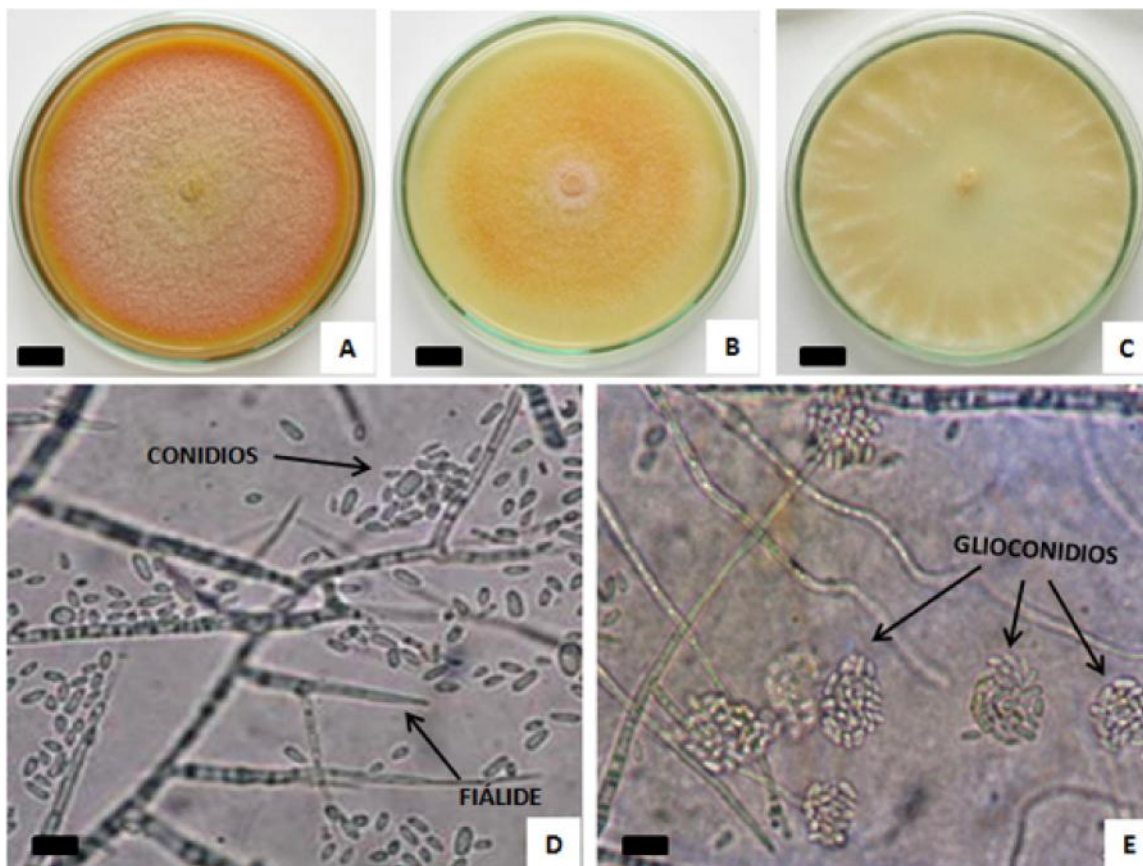


Figura 2. Tipos de colonias y estructuras morfológicas del semejante a *Acremonium* obtenidas en agar-malta 2 %. A) colonia blanca; B) colonia de color intermedio; C) colonia naranja; D) fialides y conidios; E) conidios agrupados ó gloconidios (En A, B y C la barra corresponde a 1 cm; en D y E corresponde a 10 μ m).

Las características macroscópicas de las colonias variaron en tonalidades y textura, presentándose colonias de aspecto estrellado, para los cultivos blancos y de color intermedio, mientras que los cultivos anaranjados presentaron colonias colapsadas (Newman *et al.*, 2008). El crecimiento diametral acumulado de las colonias fue de $71 \pm 0,3$ mm a los 19 días, presentando un ritmo promedio de crecimiento diametral diario de 3,8 mm. El desarrollo de las colonias presentó una tendencia de crecimiento del tipo indefinido según French & Hebert (1980). El micelio estaba constituido principalmente por conidióforos, fialides y conidios, estas últimas de formas fusiformes, hialinas, unicelulares y algunas bicelulares aunque en menor proporción (figura 2D). Los conidios unicelulares se desarrollaron en forma agrupada, formando cabezas mucosas llamadas gloconidios (figura 2E).

El largo de los conidios varió entre 4,2 y 8,4 μ m, el promedio de estas fue $5,6 \pm 0,6$ μ m, mientras que su ancho osciló entre 2,6 y 3,5 μ m, presentando un ancho promedio de $3,1 \pm 0,3$ μ m (figura 3). El largo de los conidios presentó una distribución normal ($P > 0,05$). Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($P < 0,05$), estableciendo así tres grupos.

Las fialides presentaron forma de punzón, unicelulares, hialinas y septadas en la base, creciendo en verticilos o sueltas (figura 4). El largo mínimo y máximo de las fialides osciló entre 7 y 78,4 μ m, el promedio de estas fue de $32,6 \pm 12,2$ μ m, mientras que su ancho varió entre 1,4 y 4,9 μ m, presentando un ancho promedio de $2,7 \pm 0,2$ μ m (figura 4). El largo de las fialides siguió una distribución normal ($P > 0,05$) detectándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las cepas.

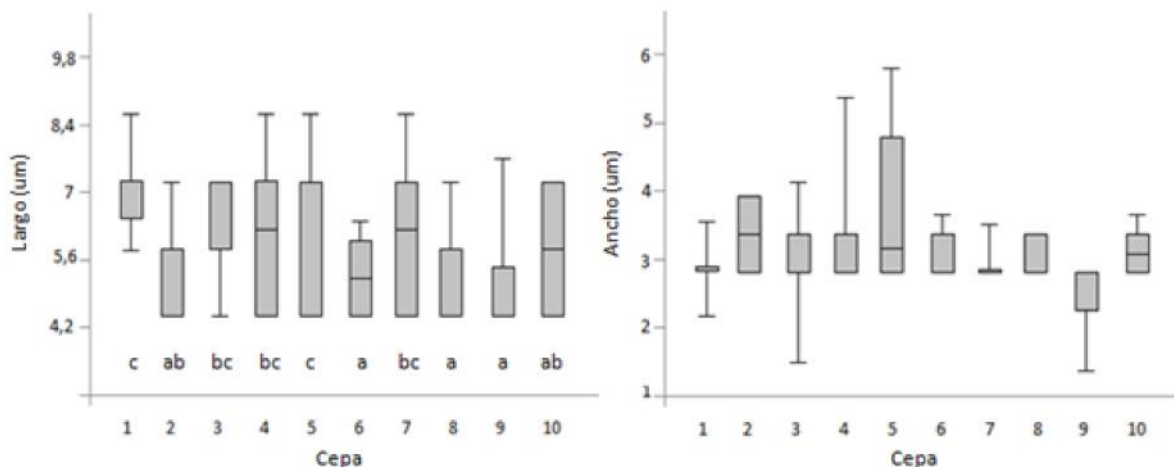


Figura 3. Largo y ancho de conidios del semejante a *Acremonium*.

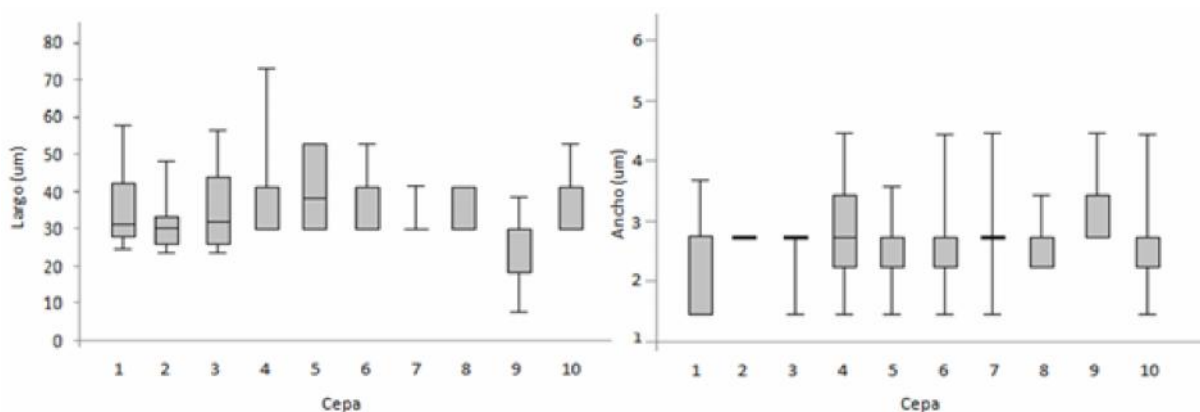


Figura 4. Largo y ancho de filidies del semejante a *Acremonium*.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio, respecto de los tres tipos de colonias, son coincidentes con lo descrito por Brayford *et al.* (2004) para el semejante a *Acremonium* en Norteamérica. Aunque estos autores no hacen mención a qué podría atribuirse esta diferencia de color de las colonias, se cree que podría estar asociado a diferencias poblacionales de las cepas de *N. fuckeliana*, considerando que en este estudio las muestras fueron obtenidas de una misma zona geográfica. Estas diferencias también han sido observadas al comparar cultivos realizados en el norte de Europa y Nueva Zelanda (Anna Hopkins, SCION, Comunicación personal), señalando que las colonias de las cepas aisladas de países europeos,

presentarían colores naranjos oscuros, y aislamientos realizados en Nueva Zelanda serían blanquecinos.

De acuerdo a la clasificación de crecimiento planteada por Domsch *et al.* (1980) el ritmo de crecimiento de las colonias del semejante a *Acremonium* es lento, similar al descrito con Brayford *et al.* (2004) quienes señalan que las colonias demoran 10 días en alcanzar un diámetro de 15 a 30 mm en agar papa dextrosa (PDA) a 20 °C, siendo más lento que el observado en el presente estudio, lo cual se puede deber al medio de cultivo o temperatura utilizada, ya que a mayor temperatura (23 °C) se espera un mayor ritmo de crecimiento. El desarrollo de las colonias presentó una tendencia similar a la de un crecimiento indefinido, el cual siguió un ritmo lineal en su desarrollo sin una fase de

aceleración o estancamiento del crecimiento, según la categoría propuesta por French & Hebert (1980).

Las diferencias significativas determinadas en la prueba estadística, para el largo de los conidios y fialides, se puede deber a la variabilidad genética entre cepas. Para el largo de los conidios se establecieron tres grupos. El que algunas cepas se repitan en dos grupos se debe a que estas no diferían significativamente de los dos grupos en los que se incluyen.

Las dimensiones de las fialides analizadas por Brayford *et al.* (2004) fueron de 30 - 70 x 1,5 - 3,5 μ m, siendo similares a las encontradas en el presente estudio. El hecho de que el largo mínimo de las fialides sea menor en el presente estudio se puede deber a que estas todavía no habían alcanzado su estado de madurez. (Brayford *et al.*, 2004) señalan que las características morfológicas del semejante a *Acremonium* presentaron una gran variabilidad. La morfología de sus colonias presentó diferentes coloraciones, texturas, largo y ancho de conidios y fialides.

En estudios con otros hongos patógenos, se ha encontrado que las características del color de las colonias, tasas de crecimiento *in vitro* y, diferencias del tamaño de las estructuras microscópicas entre cepas, tendrían que ver con las diferencias poblacionales de los hongos y que probablemente estarían relacionadas con la virulencia de ellos. Esto deberá estudiarse mediante análisis moleculares.

Sería de importancia realizar, a futuro, estudios moleculares de *N. fuckeliana* aislada en Chile, para determinar diferencias genéticas poblacionales, para ello involucrar mayor número de puntos geográficos del país. También se hace necesario evaluar la patogenicidad y virulencia a través de pruebas de patogenicidad con los distintos tipos de cepas encontrados en *P. radiata*.

De acuerdo a las características de cultivo observadas y las características micromorfológicas del hongo aislado se concluye que este pertenece al género *Acremonium*.

CONCLUSIONES

En los aislamientos realizados desde peritecios se obtuvo el estado sinamorfo *Acremonium* sp., ratificado morfológicamente con la literatura. Se obtuvieron cepas morfológicamente diferentes en cuanto a su color y características en cultivo.

Se registraron diferencias significativas entre las cepas, referentes al largo de fialides y conidios.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue desarrollado y financiado en el marco del proyecto FONDO SAG C6-110-NC-13 «Ciclo biológico y aspectos epidemiológicos de *Neonectria fuckeliana* o Revirado del Pino en plantaciones de *Pinus radiata*. Estrategias para el control de la enfermedad». Agradecimientos al Sr. Cristian Gonzalez por su colaboración en la toma de fotografías de cultivos.

REFERENCIAS

- Brayford, D.; Honda, B.; Mantiri, B. & Samuels, G.** (2004). *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: The *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidio. *Mycologia* 96(3): 572-597.
- Chaverri, P.; Salgado, C.; Hirooka, Y.; Rossman, A. & Samuels, G.** (2004). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in Micology* 68: 57-78. 2011.
- Dick, M. & Crane, P.** (2009). *Neonectria fuckeliana* in pathogenic to *Pinus radiata* in New Zeland. *Australasian Plant Disease Notes* 4(1):12-14.
- Domsch, K.; Gams, W. & Anderson, T.** (1980). *Compendium of soil fungi*. USA. Academic Press. v. 1. 859 p.

- ENSIS.** (2006). *Nectria fuckeliana* infection of *Pinus radiata* in New Zeland. Consultado 22 ago. 2010. Disponible en: <http://www.ensisjv.com/ResearchCapabilitiesAchievements/ForestHealthBiosecurityandFire/ForestPestFactSheet/Nectriaflutecanker/tabid/433/Default.aspx>.
- French, E. & Hebert, T.** (1980). Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 275 p.
- Funk, A.** (1981). Parasitic Microfungi of western trees. Canada. Canadian Forestry Service Pacific Forest Research Centre Victoria. 164 p.
- INSTITUTO FORESTAL (INFOR).** (2008). Estadísticas 2004-2005: Bosques plantados por especies según región. Consultado 19 ago. 2010. Disponible en http://www.infor.cl/webinfor/estadisticasForestales/2004_2005/Recursos_Forestales/bs0.
- Molina, E. J.** (2010). Caracterización de los estados anamorfos de *Neonectria fuckeliana* asociados a malformaciones en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don. Trabajo de Titulación, Ingeniero Forestal, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Universidad Austral de Chile. 14 p.
- Morales, R.** (2009). Detección de *Neonectria fuckeliana* en Chile, asociado a canchros y malformaciones fustales en plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 30(2):106-110.
- MUNSELL COLOR COMPANY, INC.** (1971). Munsell soil Color Charts. Baltimore, USA.
- Newman, E.; Midlej, S.; Bezerra, J.; De Souza, J. & Fiqueredo, J.** (2008). Glosario ilustrado de *Phytophthora*. Brasil. Centro de Pesquisa do Cacau. 91 p.
- Peace, T.** (1962). Pathology of trees and shrubs. With Special reference to Britain. Great Britain. Oxford University Press. 751p.
- Santibáñez, F. & Uribe, J.** (1993). Atlas Agroclimático de Chile: Regiones VIII y IX. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Laboratorio de Agroclimatología. 66 p.
- Schlatter, J.; Gerding, V. & Huber, H.** (1995). Sistema de ordenamiento de la tierra: herramienta para la planificación forestal en la X Región. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ingeniería Forestal. 93 p. (Serie Técnica).