



Universidad de Valladolid

Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible



Máster de Investigación en Conservación y Uso Sostenible de Sistemas Forestales

Trabajo Fin de Máster

Evaluación de la susceptibilidad de procedencias europeas de *Pinus sylvestris* frente al chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*)

Autor:

Juan Asdrúbal Flores Pacheco

Director:

Dr. Julio Javier Diez Casero

Co-Directores:

Dr. Jorge Matín García

Dr. Stephen Woodward

Octubre del 2015,
Palencia, España



ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1.1. Taxonomía del Chancro Resinoso del Pino (<i>Fusarium circinatum</i>).....	2
1.1.1. Nomenclatura	2
1.2. Sintomatología	2
2. El chancro resinoso del pino en Europa.....	3
II. OBJETIVOS	5
III. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Establecimiento del ensayo.....	6
3.2. Prueba de patogenicidad	8
3.3. Análisis estadístico.....	8
IV. RESULTADOS	10
4.1. Análisis de germinación en semillas inoculadas con <i>Fusarium circinatum</i>	10
4.2. Análisis de mortalidad Pre-emergencia y Post-emergencia para las procedencias evaluadas.	11
4.3. Análisis de sobrevivencia post-emergencia para plantas inoculadas con <i>Fusarium circinatum</i> con dos concentraciones esporales.....	14
V. DISCUSIÓN	20
VI. CONCLUSIONES	25
VII. BIBLIOGRAFÍA	26
VIII.ANEJOS	31



AGRADECIMIENTOS

Es imprescindible reconocer el aporte y apoyo que han realizado las distintas personas que, aunque no aparezcan aquí, han contribuido de manera esencial en esta investigación. Debo comenzar por mis directores, **Julio Javier Diez Casero** y **Jorge Martín García** por su consejo y orientación durante todas y cada una de las fases de este trabajo. De igual forma al **Dr. Stephen Woodward** que ha apoyado esta investigación por medio del proyecto “*Promoting resilience of UK tree species to novel pests & pathogens: ecological & evolutionary solutions (PROTREE)*”.

Destaco el reconocimiento a mis amigos y colegas **Pablo Martínez Álvarez** y **Jordán Muñoz Adalía**, quienes con su consejo, apoyo material, buen humor han sido compañeros incondicionales en esta y otras muchas acciones. Invaluable la experiencia y orientación del personal administrativo y de laboratorio, también compañeros, quienes de forma directa han contribuido con este resultado.

A mis maestros del curso por su apertura, consejo y disposición de escucha tanto en aspectos académicos como humanos. Quienes dignamente han cumplido con los más altos principios del proceso de enseñanza-aprendiza.

Siendo imposibles haber comenzado esta fase de mi labor investigativa sin financiamiento debo reconocer su aporte al programa de **Movilidad Académica para el Desarrollo Inclusivo en América Latina (AMIDILA) / ERASMUS MUNDUS Action 2** por el otorgamiento de la beca para estudios de máster y doctorado en la Universidad de Valladolid.

Con un gracias, no basta para manifestar el reconociendo que le debo a mi familia, quienes en la distancia son la fortaleza que cada día nutren la decisión de seguir adelante hasta hacer que los sueños sean una realidad, porque cuando lo bueno sea realidad el siguiente paso es la excelencia.

A todos ellos mi gratitud imperecedera

Juan Asdrúbal Flores Pacheco



RESUMEN

El hongo *Fusarium circinatum* (teleomorfo *Gibberella circinatum*) causante del chancro resinoso del pino, es actualmente la enfermedad más importante de masas de coníferas silvestres y comerciales a nivel mundial, ha tenido una expansión global en los últimos años amenazando a países donde aun no se conoce su presencia. En esta investigación se pretende identificar la acción patogénica pre-emergencia y post-emergencia en busca de resistencia a la enfermedad por medio de pruebas de patogenicidad de veinte procedencias europeas de *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* las cuales fueron inoculadas vía sustrato con dos concentraciones esporales (1×10^3 y 1×10^6 esporas/ml) midiendo el porcentaje de germinación y de mortalidad, el tiempo de supervivencia por cada procedencia. Aplicando la pruebas de X^2 (corrección de Yates) y el estimador de supervivencia de Kaplan-Meier para analizar los datos con un 95% de confiabilidad estadística. Demostramos que indistintamente de la concentración esporal utilizada de *Fusarium circinatum*, este hongo mata la totalidad las plantas de cada procedencia, lo que, indica que la diversidad geográfica no es un limitante a la expansión de la enfermedad al no existir resistencia y/o tolerancia a la enfermedad con una acción altamente virulenta. Demostramos la elevada susceptibilidad de *Pinus radiata* y *Pinus sylvestris* en relación a las demás por su velocidad e porcentaje mortalidad. Deben seguirse investigando con otras procedencias y especies de *Pinus* combinadas con agentes antagónicos y endófitos para el control de la enfermedad. Identificamos el elevado riesgo de las coníferas de los países donde no se ha detectado el hongo.

Palabras claves: Patogenicidad, resistencia, procedencias, *Fusarium circinatum*, supervivencia.

ABSTRACT

The fungus *Fusarium circinatum* (teleomorph *Gibberella circinatum*) that causes pitch canker Pine, is currently the most important disease of masses of wild and trade globally conifers, has been a global expansion in recent years threaten countries still not known your presence. This research aims to identify the pathogenic action pre-emergence and post-emergence for resistance to disease through pathogenicity tests of twenty European provenances of *Pinus sylvestris* and *Pinus radiata* which were inoculated via substrate with two esporales concentrations (1×10^3 & 1×10^6 spores/ml) by measuring the percentage of germination and mortality, survival time for each source. Applying the X^2 test (Yates correction) and the estimator Kaplan-Meier survival to analyze the data with 95% statistical confidence. We show that regardless of the spore, concentration used *Fusarium circinatum*; the fungus kills all plants of each source, which indicates that the geographical diversity is not a constraint to the expansion of the disease in the absence of resistance and/or tolerance disease with a highly virulent action. We demonstrate the high susceptibility of *Pinus radiata* and *Pinus sylvestris* in relation to the others for their speed and percentage mortality. They are further investigated with other sources, species of *Pinus* combined with antagonistic, and endophytes for disease control agents. We identify the high risk of conifers from countries where the fungus has not been detected.

Keywords: Pathogenicity, resistance sources, *Fusarium circinatum*, survival



I. ANTECEDENTES

1.1. Taxonomía del Chancro Resinoso del Pino (*Fusarium circinatum*)

La enfermedad conocida como Chancro resinoso del pino (PPC) es causada por el hongo *Fusarium circinatum* perteneciente a un género con más de 20 especies. Taxonómicamente se categoriza dentro del reino Fungi, sub-reino Dikarya, Filo Ascomycota, sub-filo Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, sub-clase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Nectriaceae (Pfenning *et al.*, 2014). El género *Fusarium* fue dividido en cuatro secciones para facilitar su estudio y caracterización. Los grupos infragenéricos se basan en caracteres morfológicos y moleculares (López & Díaz, 1998). Al ser descrito en la sección *Liseola* esta especie de *Fusarium* produce microconidios en cadenas y/o falsa cabezas, agrupación de células sin cohesión morfológica que no producen clamidosporas. Inicialmente se consideraron hasta 6 taxones incluyendo especies y variedades, sin embargo, estudios posteriores permitieron la reducción a una única especie denominada *Fusarium moniliforme*. Resultado de diversas revisiones la especie ha ido evolucionando en su taxonomía, destacando la agrupación de especies que se consideraban distintas en una misma. El complejo teleomorfo de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. Actualmente se conocen 46 líneas filogenéticas distintas en este grupo (Leslie *et al.*, 2007).

1.1.1. Nomenclatura

Anamorfo

Fusarium circinatum Nirenberg y O'Donnell, (Burgess *et al.*, 2004).

Teleomorfo

Gibberella circinata Nirenberg y O'Donnell (Watt *et al.*, 2011).

Nombre común

Chancro resinoso del pino (Pine Pitch Canker = PPC) (Schoenherr, 1992).

1.2. Sintomatología

El chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) es uno de los agentes patógenos más virulentos de las coníferas, siendo capaz de infectarla por vías directas (heridas e insectos vectores) y/o indirectas (viento y agua). Se caracteriza por generar coloraciones en las acículas que van desde un color amarillo hasta rojizo, hasta provocar su caída; en el eje central del árbol se generan chancros exudantes de resina, de ahí su nombre común, estos síntomas también se ven reflejados en las ramas primarias y secundarias



con menor incidencia en las terciarias (Aegerter & Gordon, 2006; Mitchell *et al.*, 2012). Se sabe que tanto semillas y las piñas pueden ser afectas por el patógeno siendo una manera de dispersión (Dwinell, 1985). Los síntomas son más fácilmente identificables en las acículas jóvenes pudiendo ser vistas también en acículas maduras. Se evidencia por coloraciones inicialmente amarillas tornándose a grisáceas o marrones, inclusive una combinación de ambas. La especie que muestra una sintomatología más clara es *Pinus radiata* (Agustí-Brisach *et al.*, 2012).

Cada uno de los hospedantes de este hongo patógeno presenta particularidades en la expresión de los síntomas de la infección. Sin embargo, se pueden describir algunas generalidades que facilitan su identificación visual. La infección se inicia en una rama que tiende a morir generando un estrangulamiento y chanco en esa zona. El crecimiento del chanco es tanto distal como proximal, creciendo mayoritariamente crece hacia arriba del árbol generando la muerte de ramas de la copa, pero también se ha registrado afectación hacia la zona baja del tranco (Dwinell *et al.*, 1998). En el caso de las especies de pinos con rebrote estos tienden a morir siendo común en todos sus hospedantes (Carey *et al.*, 2005). Ver Tabla 1.

2. El chanco resinoso del pino en Europa

Para España el primer reporte oficial de la enfermedad fue publicado por Landeras *et al.*, (2005) quienes la detectaron afectando viveros de *Pinus halepensis* y ejemplares adultos de *Pinus radiata*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris*; siendo complementado por Iturrutxa *et al.*, (2011) que identifica positiva a la enfermedad en País Vasco en una plantación de *Pinus radiata*. Para el sector maderero español *Fusarium circinatum* representa un elevado riesgo ya que en el noreste del país se concentran las plantaciones de coníferas como *Pinus radiata*, *P. pinaster*, *Pseudotsuga menziesii*, también para las poblaciones nativas de *Pinus pinaster* y *P. sylvestris* (Pérez-Sierra *et al.*, 2007). La presencia de la enfermedad por si sola ya es un riesgo, a esto se le debe sumar la asociación con insectos vectores (Bezós *et al.*, 2013). Todo esto confirmado y soportado por estudios de la Universidad de Valladolid (Martínez-Álvarez *et al.*, 2014) que muestran la elevada susceptibilidad del género de las coníferas a *Fusarium circinatum* al realizar estudios en diversas especies de *Pinus* con el objetivo de encontrar una alternativa para la sustitución de *Pinus radiata* en las plantaciones forestales del noreste español, una de las zonas en donde se localiza la infección de la enfermedad.



En 2002 el hongo ascomicete *Gibberella circinata*, teleomorfo de *Fusarium circinatum*, fue introducido en la lista A2 de la EPPO (European & Mediterranean Plant Protection Organization) organización intergubernamental de protección de la vegetación, que forma parte de la IPPC (International Plant Protection Convention) y que opera en Europa y la región mediterránea, formada por 50 estados miembros, entre ellos España. Dicha inclusión supone la recomendación de la regulación fitosanitaria del patógeno a los estados miembros. En mayo de 2006, es aprobado el Real Decreto 637/2006 de 26 de mayo y posteriormente en el Real decreto 65/2010, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del hongo *Fusarium circinatum* Niremberg & O'donnell, con el fin de poder coordinar el conjunto de actuaciones tendentes a localizar y erradicar dicho organismo, eliminando cualquier tipo de contagio, adoptando así las medidas de salvaguardia de conformidad con lo establecido en el artículo 16.2 del Real Decreto 58/2005, de 21 de enero, por el que se adoptan las medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito a terceros países.

De manera oficial se reporta la llegada del patógeno PPC (*Fusarium circinatum*) a Europa en 2005 cuando se identifica en viveros forestales de Asturias, afectando a *Pinus radiata* y *Pinus pinaster*. Más tarde se obtiene confirmación de la afectación de la enfermedad en plantaciones de *Pinus radita* en el norte de España, en el región de Cantabria (Landeras, 2005). Sin embargo, existen evidencias que sugieren la presencias en el país de *Fusarium circinatum* desde la década de 1990 (MAPA, 1996, Laucirica, et al, 1997, Dwinell et al., 1998). Recientemente (Bergal et al., 2013) ha concluido que es altamente probable que la sepa de *F. circinatum* causante de la infección en plantaciones de España provenga de Estados Unidos. En el año 2005 se confirma la detección de *F. circinatum* en Francia, la ser detectado en arboles de *Pinus menziesii* de aproximadamente 20 años de edad, situados en el jardín privado de Perpignan (EPPO, 2006). En Italia se encontró en arboles de *Pinus pinea* y *Pinus halepensis* ubicados en parques municipales y jardines (Carlucci et al., 2007).

En Europa, Portugal ha sido el último país en confirmar la presencia de esta enfermedad. En el año 2007 se detectó en viveros causando daños y muerte a plántulas de *Pinus radiata* y *Pinus pinaster* (Bragança et al., 2007).



II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster (TFM) es el comparar la patogenicidad del *Fusarium circinatum* (Chancro Resinoso del Pino) en procedencias europeas y de Turquía de *Pinus sylvestris*. Para ello se persiguen los siguientes objetivos parciales:

1. Conocer la patogenicidad de *Fusarium circinatum* (Chancro Resinoso del Pino) en *Pinus sylvestris* por medio de la evaluación de mortalidad en pre-emergencia y post-emergencia.
2. Evaluar la susceptibilidad *Pinus sylvestris* ante *Fusarium circinatum* (Chancro Resinoso del Pino).
3. Conocer las interacciones de las distintas procedencias europeas de *Pinus sylvestris* ante distintas dosis de inóculos (concentraciones esporales) de *Fusarium circinatum* (Chancro Resinoso del Pino).



III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Establecimiento del ensayo

El aislamiento del hongo *Fusarium circinatum* utilizado fue el FcCa6, colección proveniente de Cantabria aislado por el Instituto Universitario de Investigación y Gestión Forestal Sostenible de la Universidad de Valladolid, España (Martínez-Álvarez *et al.*, 2014). Para la obtención de la disolución esporal se extrajo del cultivo de este aislamiento en medio de cultivo PDA (Patata - Dextrosa - Agar). Una vez el hongo cubrió la mayor parte de la placa petri (>90%) se cortaron 3 trozos de PDA de aproximadamente 5 mm de diámetro depositándolos en 1 litro de PDB (Potato Dextrose Broth) colocando el matraz Erlenmeyer en el agitador orbital a 180 ciclos por hora durante 24 horas continuas. Esta solución fue filtrada en un embudo con dos gasas farmacéuticas de tela estéril. Se procedió al conteo de las esporas mediante un hemocitometro (cámara Thoma). Se prepararon dos concentraciones de la disolución esporal, 10^6 y 10^3 esporas por ml^{-1} , agregando agua destilada estéril. Fueron almacenadas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se procedió a la siembra de las semillas.

Las procedencias utilizadas fueron (ver tabla 2):

- 7 procedencias del Reino Unido.
- 11 procedencias del resto de Europa (incluida una de Turquía).
- 2 procedencias española utilizadas como control positivo en el estudio. Una de *Pinus sylvestris* (Valsaín, Segovia) y otra de *Pinus radiata* (Litoral astur-cántabro-Galicia).

El sustrato utilizado es una mezcla en proporción 1:1 (v:v) de turba y vermiculita mezclado homogéneamente, el cual fue autoclavado dos veces sucesivas a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Entre cada autoclavado se mezcló el sustrato para garantizar la calidad del proceso de desinfección (Iturrirxa *et al.*, 2013).

Las semillas se lavaron con agua destilada retirando los restos de posibles agroquímicos (fungicidas). Luego se sometieron a un tratamiento pre-germinativo y de esterilización externa de la semilla, para homogenizar el ritmo y porcentaje de germinación, este consistió en la sumersión en agua destilada estéril durante 12 horas continuas. Posteriormente sumergidas en peróxido de hidrogeno (agua oxigenada) al 3% durante 30 minutos y finalmente se lavaron durante cinco minutos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de peróxido de hidrogeno (Silvina *et al.*, 2010).

**Tabla 1:** Procedencias evaluadas.

Código	Especie	Procedencia	País	Datos Climáticos ¹	
				Precipitación media (mm)	Temperatura media (°C)
AU1	<i>Pinus sylvestris</i>	Hochwolkersdorf	Austria	784	7.1
AU2	<i>Pinus sylvestris</i>	Burgeralpe	Austria	1,287	5.6
AU3	<i>Pinus sylvestris</i>	Fronsburg	Austria	430	11.6
AU4	<i>Pinus sylvestris</i>	Tyrol	Austria	128	12.8
Abernety	<i>Pinus sylvestris</i>	Abernethy - East Central	Reino Unido	892	17.4
Ballochbuie	<i>Pinus sylvestris</i>	North Easte	Reino Unido	34.1	-12.6
BE	<i>Pinus sylvestris</i>	Beinn Eighe - North West	Reino Unido	611	14.4
CCC	<i>Pinus sylvestris</i>	Coille Coire Chuilc - South Central	Reino Unido	63.8	15.6
GA	<i>Pinus sylvestris</i>	North Central - Glen Afric	Reino Unido	125	17.3
GE	<i>Pinus sylvestris</i>	North Glen Eiwig	Reino Unido	10.5	17.08
GL	<i>Pinus sylvestris</i>	Glen Loy - South West	Reino Unido	17.6	12.05
GR1	<i>Pinus sylvestris</i>	Drama Region	Grecia	2,537	25
SE2	<i>Pinus sylvestris</i>	Tornik	Serbia	9.42	15.03
PO1	<i>Pinus sylvestris</i>	Bytów, Pomerania	Polonia	9.41	7.64
PO2	<i>Pinus sylvestris</i>	Krucz, Storpolen	Polonia	12.53	7.41
PO3	<i>Pinus sylvestris</i>	Woziwoda	Polonia	7.91	7.75
Rad	<i>Pinus radiata</i>	Litoral astur-cántabro-Galicia	España	1,500	22
SP	<i>Pinus sylvestris</i>	Valsaín, Segovia	España	800	11
TU1	<i>Pinus sylvestris</i>	Gatacik-Degirmendere	Turquía	9.4	30
TU2	<i>Pinus sylvestris</i>	Gatacik-Gumelidere	Turquía	8.5	31

¹ Organización Meteorologica Mundial, 2015



3.2. Prueba de patogenicidad

Se utilizaron bandejas de germinación de 76 alveolos (36 cc volumen) colocando una semilla por alveolo. Para cada procedencia se utilizaron 19 semillas, esto se repitió para cada dosis de solución esporal (10^6 y 10^3 esporas ml^{-1}), los controles se establecieron con igual cantidad de semillas. Cada procedencia fue inoculada con 1 mL solución esporal mantenida en movimiento en un agitador orbital hasta el momento de la inoculación para evitar la decantación de las esporas. El experimento se dividió en 20 bandejas, 10 de ellas se colocaron las procedencias inoculadas con *Fusarium circinatum* y en las otras 10 los controles (Cabeza *et al.*, 2006). Se mantuvieron en condiciones controladas a temperatura de 20° C y humedad relativa de 25%, bajo de régimen de riego semanal con agua destilada estéril.

La germinación fue evaluada diariamente, estimándose el porcentaje de plántulas emergidas, la cantidad de plantas vivas y muertas, velocidad de mortalidad en cada plántula inoculada y control (Lopez & Díaz, 1998). Para determinar la presencia del patógeno en las plántulas inoculadas, se procedió a su aislamiento mediante el protocolo descrito por Martínez-Álvarez *et al.*, (2014). Seleccionando una plántula aún viva de pino con síntomas de la enfermedad, se procedió a su inmersión en agua durante 3 minutos, se esterilización superficial con hipoclorito de sodio durante 1, en alcohol al 70% durante 1 minuto. Posteriormente, se sumergió durante 5 minutos en agua destilada estéril para eliminar residuos del alcohol. La planta se cortó en 5 secciones sembradas en medio de cultivo PDA. En una incubadora a 25 °C y en oscuridad se dejó crecer por 7 días. Una identificación fue llevada a cabo mediante el uso de claves morfológicas y taxonómicas. Este proceso se repitió 10 veces para cada procedencia evaluada (Leslie & Summerell, 2007).

3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la supervivencia de las plántulas de *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* frente a las distintas dosis inoculadas de *Fusarium circinatum* se llevó a cabo mediante el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier (formula 1) utilizando el paquete estadístico “Survival” implementado sobre el programa “R” (R-Development-Core-Team, 2013). En concreto, con las curvas de las funciones de supervivencia que fueron calculadas usando la función “survit (Create survival curves)” y la prueba estadística para determinar diferencias entre dos o más curvas de supervivencia se llevó a cabo usando la función “survdiff (Test survival differences)”. Se asume que el evento terminal es independiente para cada caso, las probabilidades de sobrevivir en un tiempo (t)

determinado se calculan en base a la ley multiplicativa de probabilidades. La característica distintiva es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada caso y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Debido a ello, es útil en este estudio con un número bajo de procedencias y repeticiones (Arribalzaga, 2007). Siendo $S(t)$ la función de supervivencia de la población en estudio. La probabilidad de que uno de las repeticiones vivan más allá de un tiempo t .

El análisis estadístico para estudiar el efecto de las distintas dosis de inóculos sobre la supervivencia, la germinación (a partir del control de esta investigación se han estandarizado los índices que de germinación para cada una de las procedencias), mortalidad pre-emergencia y post-emergencia se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA). A consecuencia que los datos no cumplían con las condiciones propias de un ANOVA clásico (normalidad y homogeneidad de varianzas) se optó por la utilización de métodos no paramétricos. Se utilizó la distribución Chi cuadrado (X^2) “`chisq.test(x, correct=TRUE, p)`” (R-Development-Core-Team, 2013) (Formula 2) al tener datos numéricos discretos con distribución continua. La prueba X^2 permitió determinar si las variables cualitativas estaban o no asociadas, así es estadístico X^2 mide la diferencia entre el valor esperado de las independientes y el observado con un 95% de nivel de significación (Cerdeira *et al.*, 2007). Cuando el tamaño muestras era reducido (menor de 5) la utilización de la distribución X^2 para aproximar las frecuencias se puede incurrir en sesgos en los cálculos, de modo que el valor estadístico de X^2 tiende a ser mayor. En este caso se utiliza la corrección de Yates, “`correct=F`” permitiendo eliminar el sesgo.

Fórmula 1 Estimador de Kaplan-Meier

$$S(t) = \prod_{t_i < t} \frac{n_i - d_i}{n_i}$$

Donde:

d_i = el número de muertes en el momento (**t_i**)

n_i = el número de sujetos en riesgo justo antes de **t_i** .

Fórmula 2: Chi Cuadrado (X^2).

$$X^2 = \sum \frac{(O_j - e_j)^2}{e_j}$$

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis de germinación en semillas inoculadas con *Fusarium circinatum*.

Con la finalidad de conocer el efecto pre-germinativo de las distintas dosis de *Fusarium circinatum* sobre la germinación de las semillas de *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata* se compararon los porcentajes de germinación en las bandejas inoculadas en relación a las bandejas control. Manteniendo la homogeneidad en las condiciones ambientales en todas las semillas, tanto control e inoculación, se sembraron el mismo día iniciando con las control evitando contaminación por manipulación de la suspensión esporal del hongo.

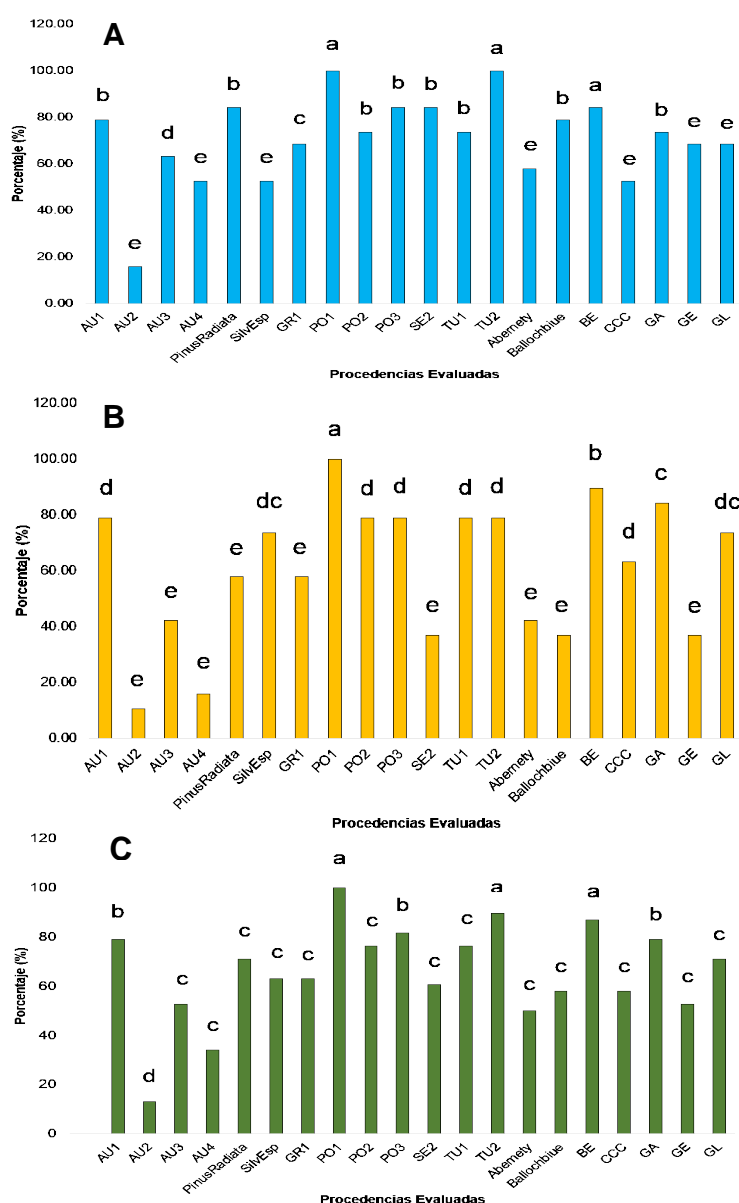


Figura 1 Efecto de la inoculación de *Fusarium circinatum* sobre la germinación en semillas de las procedencias evaluadas: **A)** Concentración esporal 10³. **B)** Concentración esporal 10⁶. **C)** Combinación de ambas concentraciones.

En el caso del porcentaje de germinación (g%) en las semillas inoculadas con *Fusarium circinatum* respecto a las semillas control se observan claramente diferencias en su comportamiento. Al ser analizado el porcentaje de germinación en la concentración esporal 1×10^3 (Fig. 10 A) se evidencia que las procedencias PO1 (g%= 100%; P= 0.002), TU2 (g%= 89.47%; P= 0.026), BE (g%= 86.84%; P= 0.001) presentan los porcentajes de germinación más elevados mientras que el menor AU2 (g%= 13.16%; P= 0.001). Datos similares son arrojados en hacer el mismo análisis en la concentración esporal de 1×10^6 (Fig. 10 B) donde las procedencias: PO1 (g%= 100%; P= 0.003), TU2 (g%= 100%; P= 0.000), BE (g%= 84.21%; P= 0.03) y el menor AU2 (g%= 15.79%; P= 0.005). El análisis conjunto (Fig. 10 C) de estos datos permite identificar la diferencia estadística en las procedencias PO1 (g%= 100%; P= 3×10^{-8}), TU2 (g%= 89.47%; P= 2.8×10^{-11}), BE (g%= 86.84%; P= 1.33×10^{-10}), AU2 (g%= 13.16%; P= 3.08×10^{-8}).

4.2. Análisis de mortalidad Pre-emergencia y Post-emergencia para las procedencias evaluadas.

Tabla 2: Efecto Pre-emergencia de la inoculación de *Fusarium circinatum* en semillas por procedencias evaluadas.

Procedencia	Especies	Concentración esporal a 10^3		Concentración esporal a 10^6	
		X ²	P	X ²	P
Abernety	<i>Pinus sylvestris</i>	2.661	0.102	15.481	0.000
AU1	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	1.000	0.000	1.000
AU2	<i>Pinus sylvestris</i>	4.384	0.036	15.545	0.000
AU3	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	1.000	2.661	0.102
AU4	<i>Pinus sylvestris</i>	2.753	0.097	20.688	0.000
Ballochbiue	<i>Pinus sylvestris</i>	6.909	0.008	14.147	0.000
BE	<i>Pinus sylvestris</i>	2.171	0.140	0.197	0.656
CCC	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	1.000	0.116	0.732
GA	<i>Pinus sylvestris</i>	6.755	0.009	7.238	0.007
GE	<i>Pinus sylvestris</i>	1.727	0.188	3.800	0.051
GL	<i>Pinus sylvestris</i>	0.452	0.501	3.684	0.054
GR1	<i>Pinus sylvestris</i>	10.795	0.001	0.000	1.000
PO1	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	1.000	7.758	0.005
PO2	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	1.000	0.000	1.000
PO3	<i>Pinus sylvestris</i>	0.279	0.597	2.514	0.112
RAD	<i>Pinus radiata</i>	7.238	0.007	4.885	0.027
SE2	<i>Pinus sylvestris</i>	3.198	0.073	6.909	0.008
SP	<i>Pinus sylvestris</i>	0.958	0.327	2.753	0.097
TU1	<i>Pinus sylvestris</i>	3.886	0.048	0.542	0.461
TU2	<i>Pinus sylvestris</i>	4.947	0.026	6.909	0.008



La procedencia AU2 en las concentraciones esporales 1×10^3 y 1×10^6 presenta $P = 0.03$ y 0.000 , respectivamente. En el mismo orden se expresan estos valores para GA (0.009 ; 0.007), Rad (0.007 ; 0.008). Demostrando la susceptibilidad de las semillas indistintamente a la concentración de esporas utilizadas. Por otra parte las procedencias Abernety, GE, GL, SE2 y TU1 con P respectivos de 0.000 , 0.007 , 0.050 , 0.008 demuestran susceptibilidad únicamente en la concentración más elevada (1×10^6) de solución esporal. El ensayo viene a demostrar que alta susceptibilidad de algunas procedencias siendo una herramienta al momento de la selección y planificación de establecimiento de plantaciones con fines comerciales o ambientales. Se deberán realizar más pruebas incluyendo procedencia como las utilizadas por Roux *et al.*, 2007a en la cual encuentra híbridos con aparente tolerancia a *Fusarium circinatum* o las pruebas realizadas en *Pinus pinaster* comentado por Vivas *et al.*, 2012.

Tabla 3: Efecto Post-emergencia de la inoculación de *Fusarium circinatum* en semillas por procedencias evaluadas.

Procedencia	Especies	Concentración esporal a 10^3		Concentración esporal a 10^6	
		X ²	P	X ²	P
Abernety	<i>Pinus sylvestris</i>	7.406	0.006	14.239	0.000
AU1	<i>Pinus sylvestris</i>	20.884	0.000	19.105	0.000
AU2	<i>Pinus sylvestris</i>	3.200	0.007	8.163	0.004
AU3	<i>Pinus sylvestris</i>	17.142	0.000	16.973	0.000
AU4	<i>Pinus sylvestris</i>	0.000	0.001	12.925	0.000
Ballochbiue	<i>Pinus sylvestris</i>	6.077	0.013	11.917	0.000
BE	<i>Pinus sylvestris</i>	10.858	0.001	32.000	0.000
CCC	<i>Pinus sylvestris</i>	10.208	0.001	12.153	0.000
GA	<i>Pinus sylvestris</i>	7.542	0.006	19.710	0.000
GE	<i>Pinus sylvestris</i>	9.779	0.001	12.098	0.000
GL	<i>Pinus sylvestris</i>	11.513	0.000	29.110	0.000
GR1	<i>Pinus sylvestris</i>	4.662	0.030	12.034	0.000
PO1	<i>Pinus sylvestris</i>	26.706	0.000	19.215	0.000
PO2	<i>Pinus sylvestris</i>	15.555	0.000	29.000	0.000
PO3	<i>Pinus sylvestris</i>	23.678	0.000	30.146	0.000
RAD	<i>Pinus radiata</i>	19.710	0.000	20.243	0.000
SE2	<i>Pinus sylvestris</i>	17.236	0.000	10.096	0.001
SP	<i>Pinus sylvestris</i>	10.018	0.001	10.587	0.001
TU1	<i>Pinus sylvestris</i>	9.625	0.001	21.031	0.000
TU2	<i>Pinus sylvestris</i>	21.894	0.000	17.631	0.000

El análisis de sobrevivencia (independientemente del tiempo desde la germinación a la muerte) revela que todas las procedencias son elevadamente susceptibles al efecto patógeno de *F. circinatum* al brindar $P < 0.05$. Para el caso de 1×10^3 las más sensibles son AU1, PO1, PO3, Rad, SE2, TU2, en caso de las probadas con solución esporal de



1 x 10⁶ fueron AU1, AU3, BE, GA, GL, PO2, TU1, Rad. El análisis conjunto demuestra que AU1, PO3 y Rad son las más sensibles al efecto de *F. circinatum* al generar muertes masivas en momento distintos para cada una (análisis de sobrevivencia). Los resultados del estudio demuestran una elevada mortalidad en todas las procedencias de *Pinus sylvestris* y *Pinus radiata*, indicando que la variabilidad geográfica del genero *Pinus* no es un factor que influye en el comportamiento de la enfermedad. De forma contraria a lo presentado por Martínez-Álvarez, *et al* en 2014, *Pinus radiata* presenta el mayor tiempo de sobrevivencia a la infección de *Fusarium circinatum*, teniendo la mayor velocidad de mortalidad en altas concentraciones (1x10⁶) y prolongándose en bajas concentraciones (1x10³). Este efecto se debe variado, se debe al mayor tamaño y vigor de *Pinus radiata* al ser comparado con *Pinus sylvestris*, esto influye directamente en una mayor producción de células lignificadas en sus paredes celulares, sin embargo, el la abundante concentración de esporas de *Fusarium circinatum* no permite tiempo suficiente para la restauración de la dermis de las plantas y la formación del canal de resina traumática (Barnard & Blakeslee, 2006) que por su parte *Pinus sylvestris* al presentar un desarrollo más favorece su susceptibilidad a *Fusarium circinatum* (Enebak & Stanosz, 2003). Las procedencias presentan diferencia estadística únicamente en los tiempos de sobrevivencia ya que todas demuestran susceptibilidad al patógeno.

4.3. Análisis de supervivencia post-emergencia para plantas inoculadas con *Fusarium circinatum* con dos concentraciones esporales.

Con las plántulas germinadas por cada procedencia evaluada, se llevó un registro diario de la cantidad de plantas vivas y muertas. Como complemento de esta información se registraron el momento (tiempo) de la muerte y la sintomatología expresada por cada procedencia. Estos datos fueron comparados con los registros en el control de cada procedencia por medio del análisis de supervivencia con el estimador de Kaplan-Meier realizando pruebas para todas las procedencias en función de la respuesta a la concentración esporal utilizada y a los tiempos de muerte de la planta.

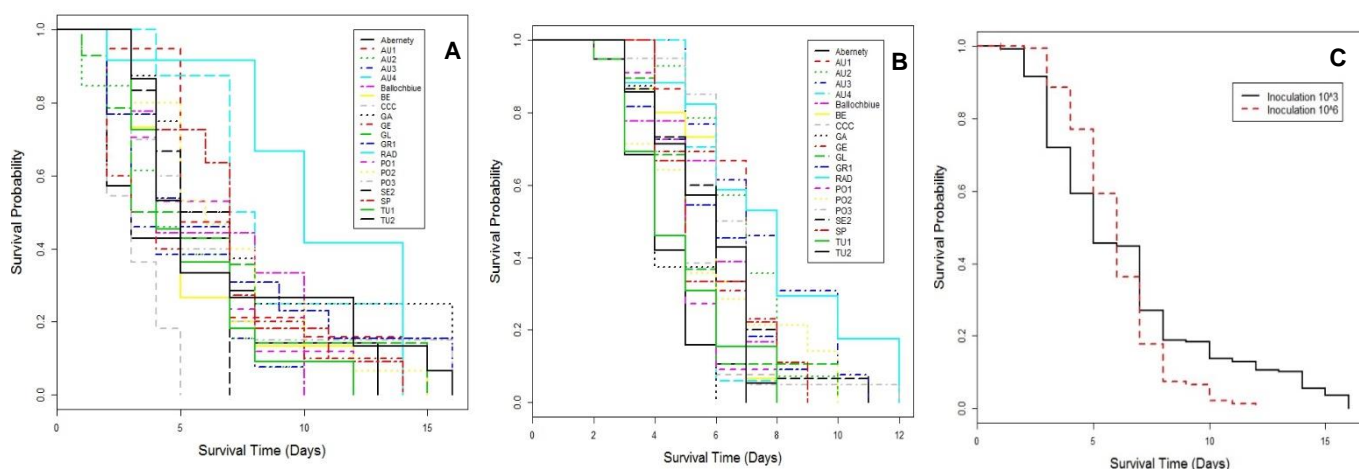


Figura 2 Comparación de las curvas de supervivencia para cada concentración. **A)** Concentración esporal 10^3 ; **B)** Concentración esporal 10^6 ; **C)** Comparación entre concentraciones.

El análisis de supervivencia basado en el método de Kaplan – Meier indica diferencia estadísticamente significativa entre la mortalidad global de las concentraciones 1×10^3 (A) y 1×10^6 (B) con $P > 0.01$. Al realizar esta misma prueba entre concentraciones en relación al tiempo (C) obviando las procedencias indican con un $P > 0.05$ que la mortalidad a *F. circinatum* es más rápida a mayor concentración esporal, sin embargo, con ambas concentraciones se obtiene 100% de mortalidad en plantas inoculadas. Se observan acículas completamente muertas con tonalidades que varían desde amarillo clorótico hasta pardo rojizo de baja tonalidad, los tallos se rompen con facilidad por acción del ahorcamiento del mismo. Una facilidad brindada por este tipo de inoculaciones es que se permite la observación de la sintomatología de la enfermedad al poder observar claramente los cambios en la tonalidad de la corteza del tallo, depresiones y/o ahorcamientos en la zona de la base de este, estas observaciones no son fácilmente observable en plantas de mayor edad ya que la resinación puede llegar hacer confusa la distinción de la acción del hongo y la defensa del árbol.

Por otra la prueba con este método de inoculación reduce el riesgo de la muerte de la planta por acción mecánica como sucede al realizar inoculaciones en tallos de plantas leñosas de mayor edad, permitiendo estar seguros que ha sido el hongo inoculado el causante de las muertes de las plántulas, para dar más validez a esto se ha re-aislamiento de *Fusarium circinatum* del tejido vegetal de las plantas inoculadas se permite asegurar que es este hongo el causante de las muertes pre-emergencia y post-emergencia analizadas en esta investigación (Gordon *et al.*, 2015), cumpliendo con los postulados de Koch (Volcy, 2008), con lo cual se sosteniente los siguientes resultados.

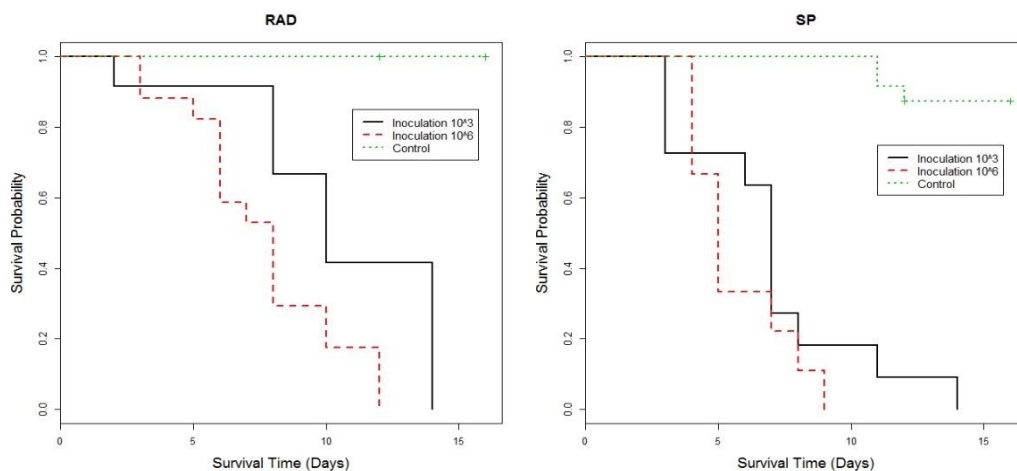


Figura 3 Curvas de supervivencia para las procedentes de España.

Las inoculaciones fúngicas y su respuesta de elevada susceptibilidad vienen a demostrar que las procedencias de *Pinus sylvestris* (SP; $P=0$, $X^2=49.3$) y *Pinus radiata* (RAD; $P=0$, $X^2=76.6$) se hallan en alto riesgo frente a *Fusarium circinatum* debido a que ambas procedencias española no han generado resistencia inducida sistemáticamente (SIR) como lo postula Bonello *et al.*, (2001) *P. radiata* tras décadas de co-existencia con el patógeno. *P. sylvestris* expresa mayor rapidez en la mortalidad in vivo, esto asociado a su menor vigorosidad en comparación a *P. radiata*.

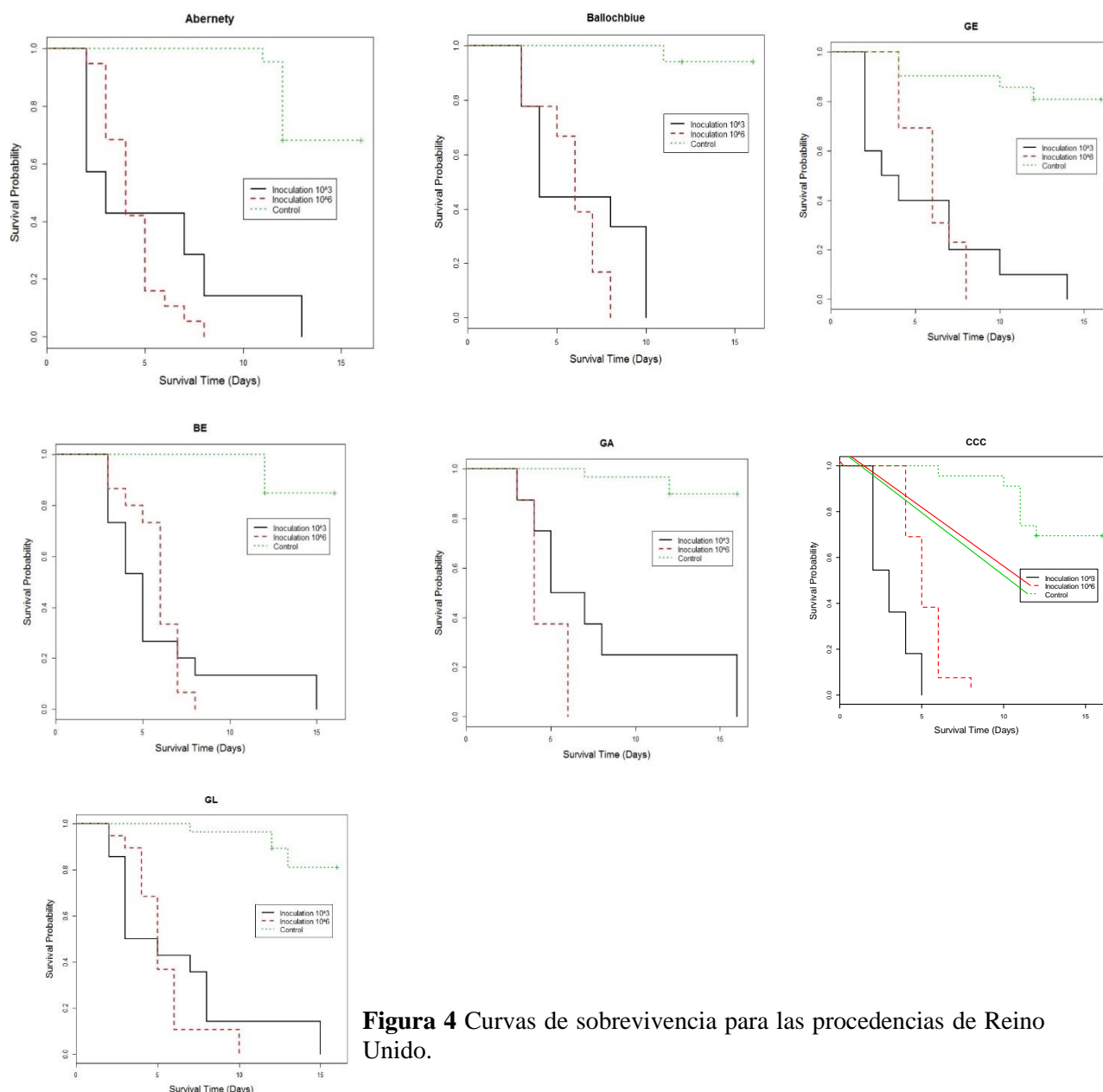


Figura 4 Curvas de supervivencia para las procedencias de Reino Unido.

Actualmente no se conoce de forma oficial la presencia de la enfermedad de Chancro resinoso del pino en Reino Unido, razón por la cual deben prestar atención a la elevada peligrosidad que sugieren los resultados de arrojados por la prueba de patogenicidad practicada a las procedencias de *P. sylvestris* colectadas en esta zona, dentro de las sensibles a la infección por *F. circinatum* destaca Abernety ($P=0$, $X^2= 60.2$). No así las demás procedencias marcando diferencias significativas al aumentar las contracción de esporas: Ballochblue ($P =0$, $X^2= 66.3$), Be ($P =0$, $X^2= 63.9$), CCC ($P =0$, $X^2= 66.3$), GA ($P =0$, $X^2= 36$), GE ($P =0$, $X^2= 57.5$), GL ($P =0$, $X^2= 49.3$), sin embargo, esto en ningún momento representa resistencia al hongo, sino únicamente la posibilidad de cierta tolerancia que debe ser estudiado con mayor profundidad.

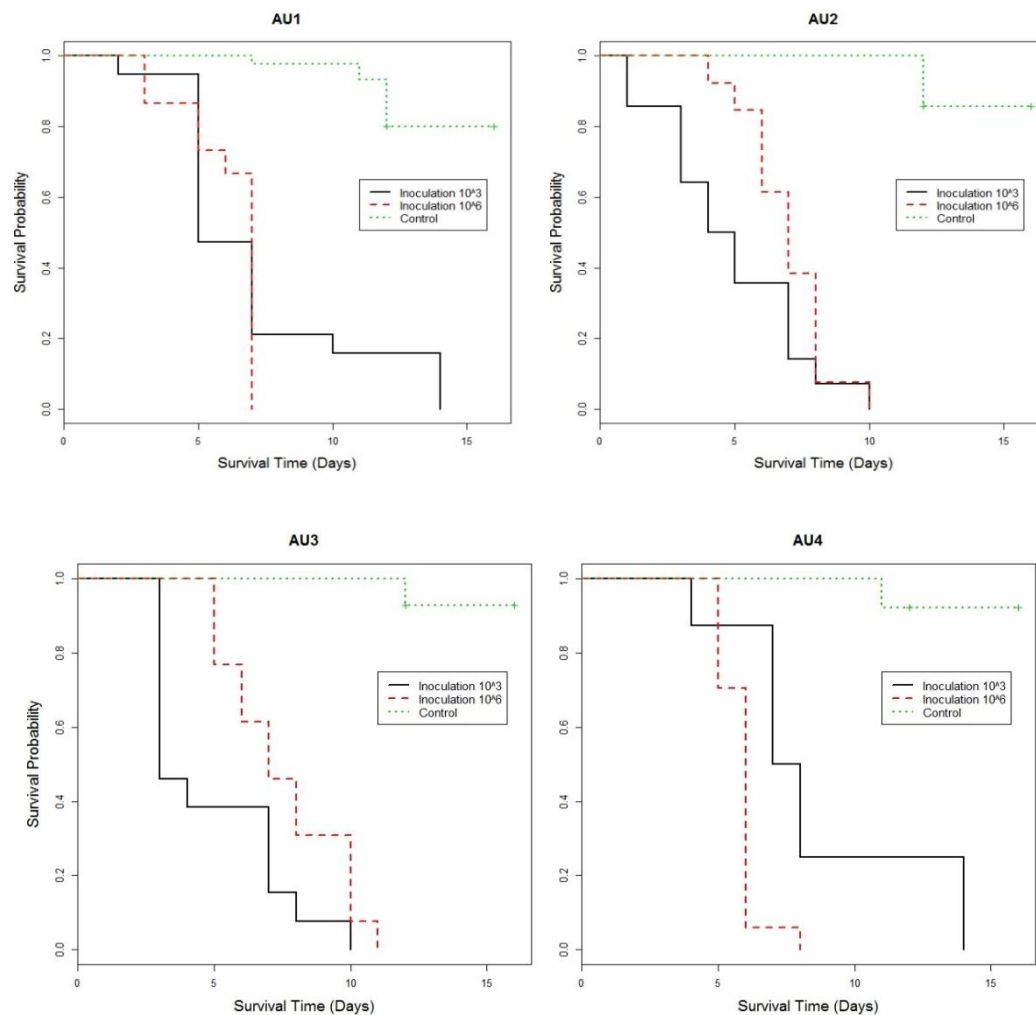


Figura 5 Curvas de sobrevivencia para las procedencias de Austria.

El análisis estadístico para las procedencias austriacas demuestra que AU1 ($P=0$, $X^2= 28.2$), AU3 ($P=0$, $X^2= 39.1$) y AU4 ($P = 0$, $X^2= 41.9$) son las más sensible al hongo evaluado. La procedencia que muestra mayor tolerancia es AU2 ($P= 0$, $X^2= 76.6$). Se hace necesario aclarar que estas pruebas se han realizado en condiciones ambientales que no son las normales para estos procedencias de *P. sylvestris*, (ver tabla 2) motivo que pudo haber favorecido la virulencia de *F. circinatum* a esta especie, de igual modo se deben probar estas especies en condiciones climáticas y edáficas locales para conocer su efecto sobre el patógeno, es sabido que este hongo posee un rango limitado de adaptación a las temperaturas y humedad reducidas lo que a la fecha se infiere ha sido un factor limitante en su expansión.

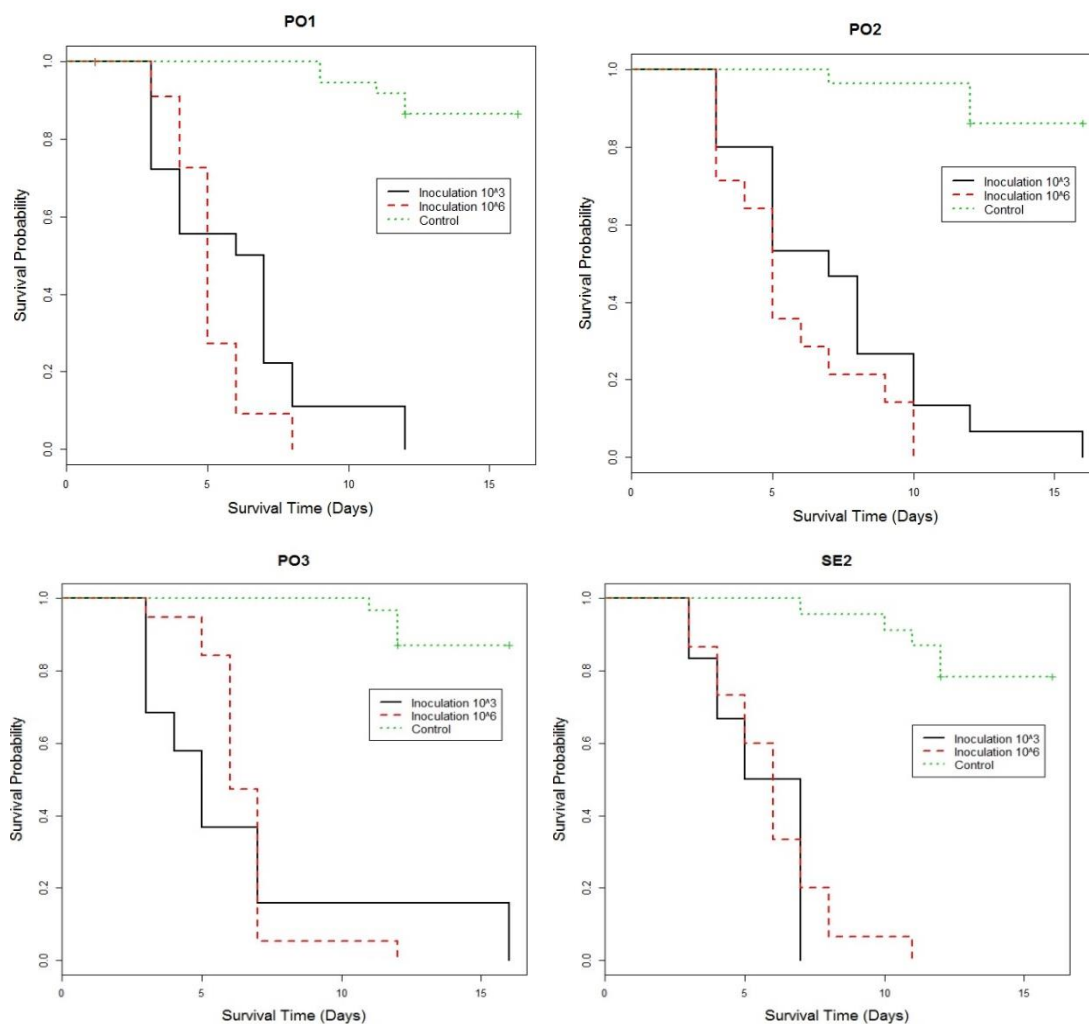


Figura 6 Curvas de supervivencia para las procedentes de Polonia y Serbia.

La mortalidad de las procedencias de Polonia PO1 ($P=0$, $X^2= 61.3$), PO2 ($P=0$, $X^2= 62.4$), PO3 ($P=0$, $X^2= 47.7$) y Serbia (SE2; $P=0$, $X^2= 49.6$) presentan comportamientos muy similares tanto en las evaluaciones pre-emergencia y post-emergencia como en las de las pruebas de patogenicidad en plántulas germinadas. Para ambos países es altamente peligroso el ingreso del patógeno a sus masas forestales, más aún, si todas son repobladas a partir de bancos de semillas comunes. Ya está demostrado que la susceptibilidad de este género esta dada por la combinación de diversidad genética y las condiciones ambientales, que para estas zonas, es favorable al patógeno. Bajo estas condiciones se deben considerar la investigación de más variedades híbridas y procedencias que permitan la identificación de plantas resistentes y/o tolerantes que faculten la reducción del peligro que significa el cancro resinoso del pino (Schmale & Gordon, 2003).

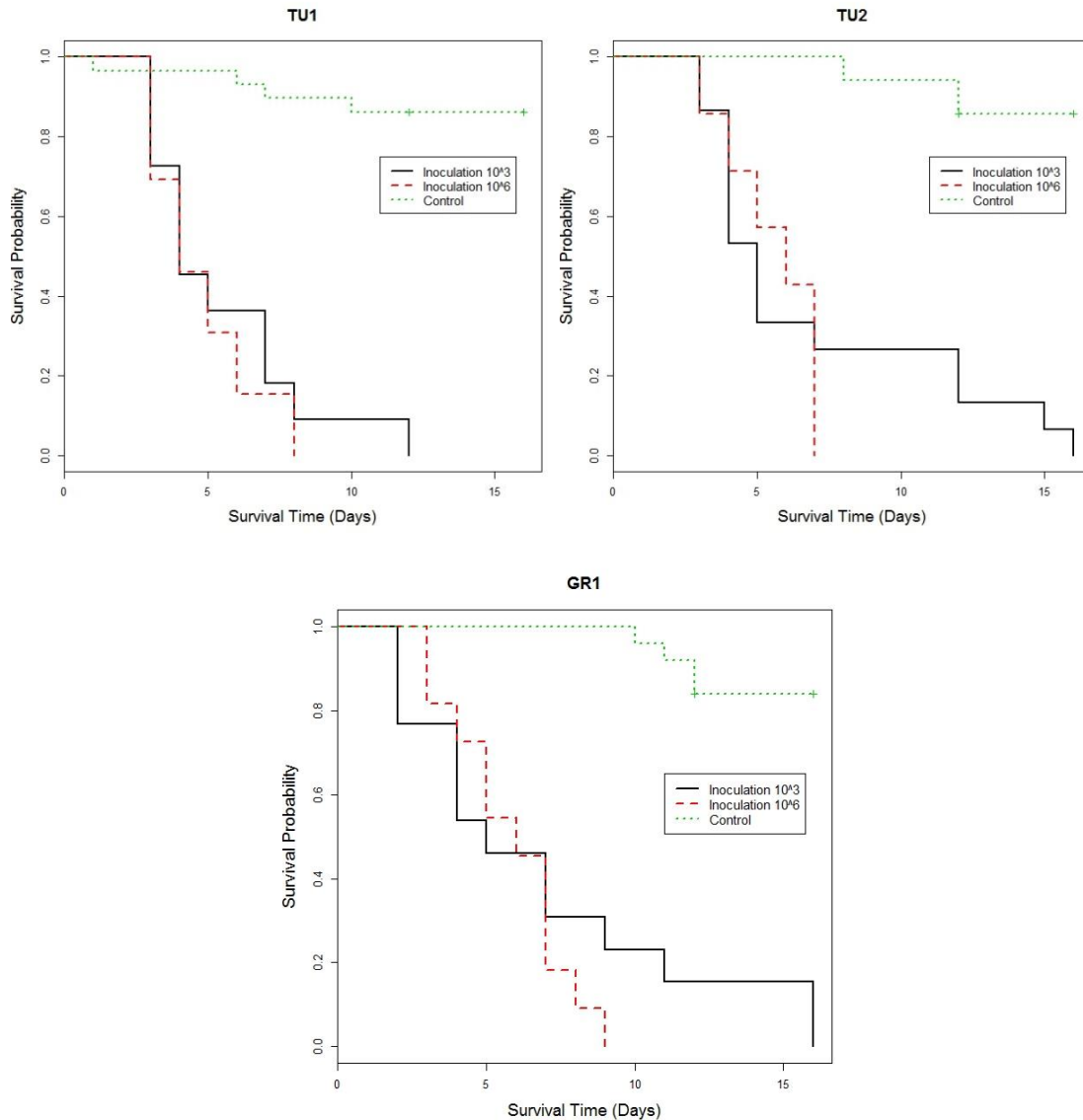


Figura 7 Curvas de sobrevivencia para las procedentes de Grecia (GR1) y Turquía (TU).

Resulta importante la destacar la alta similitud entre las respuestas de Grecia (GR1; $P=0$, $X^2= 66.9$,) y las dos procedencias de Turquía (TU1 y TU2) que responden de igual manera al patógeno ($P= 0$, $X^2= 60.4$) indicando una baja diversidad genética (alta endogamia) volviendo de interés la diversificación de las coníferas a fin de reducir el impacto de la posible entrada de la enfermedad a su territorio. Kim *et al.*, (2008) testa 6 especies híbridas del *Pinus* midiendo su susceptibilidad a *F. circinatum* obteniendo resultados diversos los cuales son alta variabilidad genética de las especies frente a una misma cepa del hongo, esto indica que la diversificación tanto de especies como de orígenes geográficos e hibridación pueden ser empleada como estrategia como estrategia de control de esta enfermedad como de otras.



V. DISCUSIÓN

Nuestros resultados son esencialmente coincidentes con otros autores. Hemos comprobado la susceptibilidad de veinte procedencias y dos especies de pino al chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) en semillas de pre-emergencia y post-emergencia así como plántulas recién germinadas al inocular el hongo con dos concentraciones esporales (10^6 y 10^3 esporas por m^{-1}) demostrando que existe diferencia significativa en cuanto a la susceptibilidad al ser relacionada con la concentración del hongo y la procedencia del género *Pinus*, sino también con el tiempo requerido por el hongo para inducir la muerte de la plántula. Estudios previos en procedencias y especies americanas, europeas y asiáticas del género *Pinus* han encontrados diferencias sustanciales en cuanto a la susceptibilidad a *F. circinatum* (Hodge & Dvorak, 2007). La mayor parte de esta información está basada en pruebas de laboratorio realizadas con inoculaciones artificiales con distintos métodos y concentraciones, sin embargo, en su mayoría estudian las mismas interacciones interespecíficas de la planta ante el patógeno a fin de evaluar su susceptibilidad (Swart & Wingfield, 1991; Gordon *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2007a).

Para reducir el estrés de las plántulas evitando que este generase variación en los datos éste ensayo ha sido realizado bajo condiciones controladas con la finalidad de evaluar correctamente el efecto de *F. circinatum* sobre las procedencias testadas (Dwinell, 1985; Owen & Adams, 2001; Barnard & Blakeslee, 2006). Coincidentemente con lo publicado por Iturrutxa *et al.* (2013) nuestros resultados sitúan a *P. radiata* como el más susceptible al chancro resinoso con un tiempo de muerte directamente relacionado con la cantidad de esporas inoculadas. Estos datos son coherentes con los reporte de campo de las zonas afectadas en España, donde en los rodales donde coexisten más de una especie de *Pinus*, siendo una de ellas *P. radiata* es esta última la más afectada al ser comparada con *P. pinaster* y *P. nigra*, que a pesar de estar infectada presentan menor severidad de la afectación debiendo investigar el caso de una posible tolerancia o resistencia sistemática inducida (Iturrutxa *et al.*, 2012; Pérez-Sierra *et al.*, 2007; Marínez-Alvarez *et al.*, 2014).

Sin embargo, se han dado informes contrastantes en la literatura en cuanto a la variación en la susceptibilidad dentro del género *Pinus sp.* (Hodge & Dvorak, 2007), por ejemplo, reportaron poca o ninguna tolerancia al chancro al comparar las colecciones de las poblaciones nativas, unas con control de polinización, otras sin este control, siendo las más susceptibles las de polinización controlada (Wikler & Gordon, 2000). En



contraste, otros investigadores han reportado una considerable variación en la susceptibilidad dentro de *P. radiata* (Correll *et al.*, 1991, Barrows-Broadus, Dwinell, 1985) estas diferencias en los resultados podría explicarse por las diferencias en las técnicas de inoculación usados y/o las diferencias en el muestreo genético llevado a cabo en los diferentes estudios, esto a su vez pueden ser indicios que la variación en la heredabilidad de la sensibilidad al patógeno en esta y otras especies (Vivas *et al.*, 2012).

En los trabajo publicados por Krokene *et al.*, (1991) y Christiansen *et al.* (1999), incursionan en la posibilidad de identificar la SIR en coníferas asociadas al abeto rojo (*Picea abies*) contra el escarabajo de la corteza (*Dendroctonus ponderosae*) vinculada a varios patógenos de esta especie, sin embargo, no se encuentran pruebas suficientes para su determinación exitosa. Se ha continuado con la protección inducida localizada con el uso de hongos ectomizorrízicos, citando el caso de *Laccaria laccata* que es capaz de poblar la rizosfera de la planta de otorgando protección a la planta como lo describe Sylvia y Sinclair (1983) probada ante *Fusarium oxysporum* en *P. radiata* y *Sphaeropsis sapinea* que causa el tizón rodaje, marchitez corona, chancro y mancha de savia en un número de especies de coníferas, registrando un efecto no sistémico sino focalizado. Se continua con progresos alentadores cuando Enebak y Carey (1998) induce la protección sistemática en *P. taeda* contra la roya fusiforme (*Cronartium quercuum f.sp. fusiforme*), de igual manera Bonello *et al.*, (2001) comenta la resistencia inducida de *P. sylvestris* a *Botrytis cinérea* por medio de la micorriza *Hebeloma crustuliniforme*.

Tomando como referencia estos estudios sumando el hecho que *F. circinatum* afecta en diversos grados a todo el género *Pinus* y con mayor severidad a *P. radiata* que a la fecha es la conífera más ampliamente sembrada en España y el mundo con aproximadamente 4 millones de hectáreas (Donoso *et al.*, 2015) se evidencia la importancia de explorar en la posibilidad de la inducción o focalización de protección a la planta por medio de respuestas físico-químicas y/o protección con otros agentes (hongos y bacterias) antagónicos – endófitos. Los resultados de este estudio mostraron claras diferencias en la susceptibilidad, tanto a las especies y el nivel concentración de esporas, así como a una dentro de las procedencias. La sintomatología observada indica que no se dan variaciones entre especies ni tampoco que el hongo ha sufrido variaciones desde su aparición pues coinciden con estudios de Gordon *et al.*, (1998b) y Carlucci, & Colatruglio, (2007) en *P. pinea* en los que se describe un mismo comportamiento de la enfermedad de a parir de aislados y procedencias distintas en con casi una década de diferencia entre ensayos, volviéndose una herramienta para la estimación de la susceptibilidad y tolerancia de las plantas en vivero y plantaciones ante



esta enfermedad, permitiendo tomar las acciones preventivas y/o correctivas en una ventana de tiempo real.

A pesar de que en todas las procedencias evaluadas se haya dado la muerte la totalidad de las plantas, indistintamente de la procedencia, se daban muertes asintomáticas de la enfermedad. Este comportamiento indica la presencia del hongo en estado latente dentro del tejido vegetal de la planta (Barrows-Broadus, Dwinell, 1985). Esta característica podrían apuntar a una mayor peligrosidad de lo pensado en cuanto a la diseminación de este hongo, debido a que al no presentar sintomatología que facilite su identificación visual que lleve a los análisis de laboratorio correspondiente, se incrementa el riesgo de manejo inadecuado de residuos vegetales vivos y/o muertos infectados convirtiéndose en una vía de dispersión que puede variar en sus dimensiones desde lo local hasta la extensión a nuevos territorios donde no se cuenta con la enfermedad y por consiguiente en masas de coníferas altamente vulnerables al no contar con resistencia y/o tolerancia inducida por la co-evolución inexistente (Gordon *et al.*, 1996). Las especies *P. sylvestris* y *P. radiata* en todas sus procedencias demuestran ser susceptibles en distintos grados durante la fase de infección. De manera similar sucede con Landeras (2005) que luego de realizar pruebas de patogenicidad en plántulas de estas especies junto con *P. halepensis* y *P. pinaster* en viveros de España y Portugal midiendo la longitud de la necrosis vascular son *P. sylvestris* y *P. radiata* las más afectadas mientras las demás en presentan daños menores a pesar de morir por la infección.

A la fecha no se cuenta con reportes de presencia de *F. circinatum* en los países de los que proceden las semillas evaluadas, a excepción de España, pero eso no debe ser una razón por la cual se reduzca la vigilancia y control del material vegetal pues está demostrado que por medio de aislamientos la presencia del hongo tanto en madera, semillas, piñas y flores de pinos (Penalta *et al.*, 2008) material frecuentemente movido de un país a otro. Si bien es cierto, este estudio demuestra mayor tiempo de sobrevivencia de *Pinus radiata* a las infecciones es precipitado hacer recomendaciones al respecto ya que se conoce que *Fusarium circinatum* desarrolla la fase más agresiva de la afectación a plantaciones y/o bosques muchos años después de su aparición (Erbilgin *et al.*, 2008) lo que puede responder a una fase infecciosa asintomática de adaptación al entorno para luego continuar con su expansión con mayor agresividad. En el caso de los viveros es el principal agente de muertes en coníferas, se denomina *Damping-off* o mal del talluelo.

La expansión y afectación de la enfermedad también es favorecida y acelerada por las variaciones ambientales efecto del cambio climático (Ganley *et al.*, 2009). Basado en modelos matemáticos y climáticos que interaccionan datos obtenidos de campo y escenarios basados en la susceptibilidad de las especies de coníferas se prevé que continúe su avance manteniéndose como el patógeno de mayor peligrosidad a las masas forestales, tanto silvestres como comerciales, de pinos en el mundo (Wingfield *et al.*, 2008a) lo que a su vez incrementa los efectos del cambio climático por la degradación de los bosques destruyendo los sumideros de CO₂ (Battles *et al.*, 2007). Esta hipótesis ha sido estudiada por Runion *et al.*, (2010) al inocular *F. circinatum* y *Cronatium quercuum* en plantas de *Pinus taeda* que posteriormente se expusieron a niveles ambientales y elevados de CO₂ comprobando que no tiene ningún efecto negativo en la severidad de ambos hongos, por el contrario, se encontró que estas condiciones han favorecido al hongo aumentando el tiempo que este puede estar en latencia. A la fecha la expansión de esta enfermedad no ha superado Europa Central y Norte (España, Portugal, Italia y Francia) que no le son aptas las condiciones ambientales, más frías, de la parte septentrional del continente, a esto se le debe sumar la imposibilidad de las esporas de superar la discontinuidad física y geográfica de masas forestales que pueda utilizar como medio de expansión, sin embargo, esto no es en ningún momento una garantía que el hongo no podría aprovechar escenarios de aumentos en las temperaturas y la humedad relativa para invadir nuevas áreas europeas, aun más, si no se atienden a las medidas preventivas y de cuarentena del material vegetal que este utiliza para su expansión (Möykkynen *et al.*, 2014) por lo que no deja de ser un potencial invasor a estas nuevas áreas que aun no están infectadas pero los resultados de este estudio muestran su susceptibilidad al patógeno.

Con los resultados presentados se hace necesario seguir evaluando especies que puedan presentar resistencia natural dentro de las que las más prometedoras son *P. pinaster* (Vivas *et al.*, 2012), *P. taeda* y *P. ellioti* (Wingfield *et al.*, 2008a) y algunas especies híbridas (Mitchell *et al.*, 2012), también se deben de valorar la complementación con medidas de control preventivo a la entrada de la enfermedad (Alves-Santos & Diez, 2011).

Queda claro en este estudio de patogenicidad con diferentes procedencias y especies de *Pinus sp.* Presentan grandes oportunidades para desarrollar plantaciones tolerantes al chancro del pino. Dentro de ensayos de selección de especies e híbridos, *Pinus oocarpa* y *Pinus patula*, híbridos de *Pinus radiata*, para ejemplo, mostraron una variación en la susceptibilidad, con algunas de estas selecciones de agrupamiento entre



el material más tolerante. Esto sugiere que hay excelentes oportunidades no sólo para combinar propiedades de la madera deseables, pero también la tolerancia al terreno de expansión del chancro resinoso del pino en el futuro. Selecciones híbridas sudafricanas (Wingfield *et al.*, 2013), entre ellos *P. oocarpa* y *P. caribaea*, eran más tolerantes a la infección por *Fusarium circinatum*. Estos resultados son consistentes con los de Hodge & Dvorak en 2007, quienes demostraron que *P. oocarpa* y *P. caribaea* se encontraban entre los más tolerantes en sus ensayos.

En estos deben de integrarse una serie de nuevas co-variables destacando la edad de la planta, su diámetro y altura a fin de caracterizar la acción del patógeno en distintas especies, familias e híbridos de pinos en diversos momentos y condiciones de desarrollo vegetativo permitiendo entender en que momento son más susceptibles y, si las condiciones de manejo como de desarrollo inducen una mayor tolerancia brindando un periodo mayor para la reacción en viveros y/o plantaciones (Roux *et al.*, 2007b). No obstante no se deben despreciar datos como los que discute Martín-Rodriguez *et al.*, (2013) quienes Para evaluar la dinámica espacial y temporal de crecimiento de este patógeno en el *P. radiata*, analizó el proceso de infección usando PCR en tiempo real para cuantificar la biomasa fúngica dentro de la planta huésped, paralelamente se utilizó microscopía focalizada para la detección de una proteína fluorescente verde (GFP)-etiquetados cepa de *F. circinatum*. El crecimiento de este patógeno exhibió tres fases distintas: un aumento exponencial inicial en la biomasa fúngica, concomitante con la colonización de patógenos de la corteza y el floema; una desaceleración en el crecimiento de hongos coincide con esporulación hifas dentro del huésped; y la estabilización de la biomasa fúngica cuando aparecieron los síntomas de marchitamiento. Encontró que el número de conductos de resina en el xilema aumentaron en respuesta a la infección y el hongo creció dentro ambos conductos de resina constitutivos y traumáticos. Estos resultados indican que esta respuesta defensiva puede contribuir a la difusión espacial o temporal del patógeno. Queda la interrogante, que si la generación de los conductos de resina traumáticos puede ser de más beneficioso para el hongo que a la planta.



VI. CONCLUSIONES

Los datos suministrados por las pruebas de patogenicidad con dos concentraciones de esporales del hongo causante del chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) frente 20 procedencias europeas del género *Pinus* de permiten concluir:

1. Se ha confirmado la acción patogénica del chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) tanto en semillas (pre-emergencia) y plántulas (post-emergencia) causando la muerte de estas por pudrición de la semillas y ahorcamiento del cuello de la raíz, respectivamente.
2. La totalidad de las procedencias evaluadas son susceptibles al hongo evaluado, sin embargo, las más sensibles corresponden a Abernety (Reino Unido), *Pinus radiata* (España) y AU2 (Austria) al tener los mismos porcentajes de muerte sin importar la concentración esporal a la que fueron expuestas.
3. En base a los resultados de las pruebas de patogenicidad con las distintas concentraciones esporales, no se ha identificado resistencia y/o tolerancia al chancro resinoso del pino (*Fusarium circinatum*) asociado a la diversidad geográfica de las procedencias *Pinus* evaluadas, lo que, confirma el peligro que representa la enfermedad a las masas forestales de coníferas sin importar su ubicación debido a la alta virulencia del hongo.
4. Se sugiere nuevas pruebas con nuevas especies de coníferas al igual que la combinación de agentes antagónicos *in vivo* como alternativa para el control de la enfermedad.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aegerter, B.J., Gordon, T.R., 2006. Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). For. Ecol. Manage. doi:10.1016/j.foreco.2006.07.011
- Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., García-Jiménez, J., Berbegal, M., 2012. Efficacy of hot water treatment to reduce the incidence of *Fusarium circinatum* on *Pinus radiata* seeds. Forestry. doi:10.1093/forestry/cps074
- Alves-Santos, F.M., Diez, J.J., 2011. CONTROL OF FUSARIUM DISEASES.
- Arribalzaga, E.B., 2007. Interpretación de las curvas de supervivencia. Rev. Chil. cirugía 59. doi:10.4067/S0718-40262007000100013
- Barnard, E.L., Blakeslee, G.M., 2006. PITCH CANKER OF SOUTHERN PINES.
- Barrows-Broadus, j., Dwinell, L.D., 1985. Branch Dieback and Cone and Seed Infection Caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in a Loblolly Pine Seed Orchard In South Carolina. Phytopathology.
- Battles, J.J., Robards, T., Das, A., Waring, K., Gilles, J.K., Biging, G., Schurr, F., 2007. Climate change impacts on forest growth and tree mortality: A data-driven modeling study in the mixedconifer forest of the Sierra Nevada, California. Clim. Change 87. doi:10.1007/s10584-007-9358-9
- Berbegal, M., Pérez-Sierra, A., Armengol, J., Grünwald, N.J., 2013. Evidence for Multiple Introductions and Clonality in Spanish Populations of *Fusarium circinatum* 103.
- Bezós, D., Diez, J., Fernández, M., 2013. Fungi and insects diversity associated to pitch canker disease in *Pinus radiata* in northern Spain.
- Bonello, Gordon, Storer, 2001. Systemic induced resistance in Monterey pine. For. Pathol. doi:10.1046/j.1439-0329.2001.00230.x
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F., Amaro, P., 2007. First Report of Pitch Canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. Plant Dis. 95, 770.
- Burgess, T.I., Gordon, T.R., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., 2004. Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. Mycol. Res. doi:10.1017/S0953756204001443
- Cabeza, A., Santamaria, O., Alves-Santos, F.M., Pajares, J.A., Diez, J.J., 2006. Control Biológico de *Fusarium circinatum* Mediante el Hongo Antagonista *Trichoderma viride*, in: XIII Congreso de La Sociedad Española de Fitopatología, 18 - 22 de Septiembre de 2006. p. 134.
- Carey, W.A., Oak, S.W., Enebak, S.A., 2005. Pitch canker ratings of longleaf pine clones correlate with *Fusarium circinatum* infestation of seeds and seedling mortality in containers. For. Pathol. doi:10.1111/j.1439-0329.2005.00404.x



- Carlucci, A., L. Colatruglio, and S.F., 2007. First Report of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Dis.* 91, 1683.
- CERDA L, JAIME, & VILLARROEL DEL P, L., 2007. Interpretación del test de Chi-cuadrado (X^2) en investigación. *Rev. Chil. pediatría* 78(4), 414–417.
- Correll, J.C., Gordon, T.R., McCain, A.H., Fox, J.W., Koehler, C.S., Wood, D.L., Schultz, M.E., 1991. Pitch Canker Disease in California: Pathogenicity, Distribution, and Canker Development on Monterey Pine (*Pinus radiata*). *Plant Dis.* 75, 676–682.
- Donoso, A., Rodriguez, V., Carrasco, A., Ahumada, R., Sanfuentes, E., Valenzuela, S., 2015. Relative expression of seven candidate genes for pathogen resistance on *Pinus radiata* infected with *Fusarium circinatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* doi:10.1016/j.pmpp.2015.08.009
- Dwinell, L.D., 1985. Pitch Canker: A Disease Complex of Southern Pines. *Plant Dis.* doi:10.1094/PD-69-270
- Dwinell, L.D., Adams, D., Guerra-Santos, J.J., Aguirre, J.R.M., 1998. Pitch canker disease of *Pinus radiata*, in: VII International Congress of Plant Pathology, 9 - 16 August 1998.
- Enebak, S.A., Stanosz, G.R., 2003. Responses of conifer species of the Great Lakes region of North America to inoculation with the pitch canker pathogen *Fusarium circinatum*. *For. Pathol.* doi:10.1046/j.1439-0329.2003.00334.x
- EPPO, 2006. Organisation Europeenne Et Mediterranee Pour La Protection Des Plantes.
- Erbilgin, N., Ritokova, G., Gordon, T.R., Wood, D.L., Storer, A.J., 2008. Temporal variation in contamination of pine engraver beetles with *Fusarium circinatum* in native Monterey pine forests in California. *Plant Pathol.* 57, 1103–1108.
- Ganley, R.J., Watt, M.S., Manning, L., Iturrutxa, E., 2009. A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Can. J. For. Res.* doi:10.1139/X09-131
- Gordon, T.R., Kirkpatrick, S.C., Aegerter, B.J., Wood, D.L., Storer, A.J., 2006. Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph = *Fusarium circinatum*). *Plant Pathol.* doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01351.x
- Gordon, T.R., Okamoto, D., Storer, A.J., Wood, D.L., 1998. Susceptibility of five landscape pines to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *HortScience* 33, 868–871.
- Gordon, T.R., Storer, A.J., Okamoto, D., 1996. Population structure of the pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in California. *Mycol. Res.* doi:10.1016/S0953-7562(96)80033-5
- Gordon, T.R., Swett, C.L., Wingfield, M.J., 2015. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Prot.* doi:10.1016/j.cropro.2015.02.018
- Hodge, G.R., Dvorak, W.S., 2007. Variation in pitch canker resistance among provenances of *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* from Mexico and Central America. *New For.* doi:10.1007/s11056-006-9023-6



- Iturrirxa, E., Ganley, R.J., Raposo, R., García-Serna, I., Mesanza, N., Kirkpatrick, S.C., Gordon, T.R., 2013. Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. For. Pathol. doi:10.1111/efp.12061
- Iturrirxa, E., Ganley, R.J., Wright, J., Heppe, E., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., Wingfield, M.J., 2011. A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain. Fungal Biol. doi:10.1016/j.funbio.2010.12.014
- Iturrirxa, E., Mesanza, N., Elvira-Recuenco, M., Serrano, Y., Quintana, E., Raposo, R., 2012. Evaluation of genetic resistance in *Pinus* to pitch canker in Spain. Australas. Plant Pathol. doi:10.1007/s13313-012-0160-4
- Kim, Y.S., Woo, K.S., Koo, Y.B., Yeo, J.K., 2008. Variation in susceptibility of six pine species and hybrids to pitch canker caused by *Fusarium circinatum*. For. Pathol. doi:10.1111/j.1439-0329.2008.00558.x
- Landeras, E., 2005. Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus spp.* in Northern Spain. Dis. Notes.
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., Méndez-Lodos, S., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., Berbegal, M., Beltrán, R., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2005. Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus spp.* in Northern Spain. Plant Dis. 89, 1015–1015.
- LAUCIRICA, A.M., 1997. presencia de *Fusarium subglutinans* F. sp *pini* en viveros de pino radiata en Bizkaia., in: In Actas XIV Reunión Anual Del Grupo de Trabajo Fitosanitario de Forestales, Parques Y Jardines. 18-20 de noviembre de 1997, pp. 301–303.
- Leslie, J.F., Anderson, L.L., Bowden, R.L., Lee, Y.W., 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. Int. J. Food Microbiol. 119, 25–32. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.059
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2007. The Fusarium Laboratory Manual, The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing.
- Lopez, C.M., Díaz, M.A., 1998. Ensayos de patogenicidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D. Don.
- Marínez-Alvarez, P., Pando, V., Diez, J.J., 2014. Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. doi:10.1111/ppa.12187
- Martínez-Álvarez, P., 2015. Environmentally friendly methods for the integrated management of pine pitch canker (PPC) disease. University of Valladolid - INIA.
- Martínez-Álvarez, P., Vainio, E.J., Botella, L., Hantula, J., Diez, J.J., 2014. Three mitovirus strains infecting a single isolate of *Fusarium circinatum* are the first putative members of the family Narnaviridae detected in a fungus of the genus *Fusarium*. Arch. Virol. doi:10.1007/s00705-014-2012-8
- Martín-Rodríguez, N., Espinel, S., Sanchez-Zabala, J., Ortíz, A., González-Murua, C., Duñabeitia, M.K., 2013. Spatial and temporal dynamics of the colonization of *Pinus radiata* by *Fusarium*



- circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytol.* 198, 1215–1227. doi:10.1111/nph.12222
- Mitchell, R.G., Coutinho, T.A., Steenkamp, E., Herbert, M., Wingfield, M.J., 2012a. Future outlook for *Pinus patula* in South Africa in the presence of the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *South. For.* 74, 203–210.
- Mitchell, R.G., Wingfield, M., Steenkamp, E., Coutinho, T., 2012b. Tolerance of *Pinus patula* full-sib families to *Fusarium circinatum* in a greenhouse study. *South. For. a J. For. Sci.* 74, 247–252.
- Mitchell, R.G., Wingfield, M.J., Hodge, G.R., Dvorak, W.S., Coutinho, T. a., 2013. Susceptibility of provenances and families of *Pinus maximinoi* and *Pinus tecunumanii* to frost in South Africa. *New For.* 44, 135–146. doi:10.1007/s11056-012-9306-z
- Möykkönen, T., Capretti, P., Pukkala, T., 2014. Modelling the potential spread of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Europe. doi:10.1007/s13595-014-0412-2
- Organización Meteorologica Mundial, 2015. Organización Meteorologica Mundial [WWW Document]. Serv. Inf. meteorológica Mund.
- Owen, D., Adams, D., 2001. Impact of pitch canker on ornamental monterey pines in Santa Cruz county, California, U.S., 1987-2000. *J. Arboric.*
- Penalta, B.G., Varela, C.P., Pedro, J., Vázquez, M., Casal, A., Otero, P., 2008. Semillas De *Pinus Spp*. En Galicia 154, 149–154.
- Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus spp.* in northern Spain. *Mycol. Res.* doi:10.1016/j.mycres.2007.05.009
- Pfenning, L.H., Da Silva Costa, S., Pereira De Melo, M., Costa, H., Ventura, J.A., Auer, C.G., Figueredo, Á., Santos, D., 2014. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 39, 210–216.
- R-Development-Core-Team, 2013. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing.
- Roux, J., Eisenberg, B., Wingfield, M.J., Kanzler, a., Nel, a., Coetzee, V., Kietzka, E., 2007a. Testing of selected South African *Pinus* hybrids and families for tolerance to the pitch canker pathogen, *Fusarium circinatum*. *New For.* 33, 109–123. doi:10.1007/s11056-006-9017-4
- Runion, G.B., Prior, S.A., Rogers, H.H., Mitchell, R.J., 2010. Effects of elevated atmospheric CO₂ on two southern forest diseases. *New For.* doi:10.1007/s11056-009-9170-7
- Schmale, D.G., Gordon, T.R., 2003. Variation in susceptibility to pitch canker disease, caused by *Fusarium circinatum*, in native stands of *Pinus muricata*. *Plant Pathol.* doi:10.1111/j.1365-3059.2003.00925.x
- Schoenherr, A. a., 1992. Sierra Nevada. *A Nat. Hist. Calif.* 772.



- Silvina Soria Orientadora, B., Alonso, R., 2010. Determinación de la presencia de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus taeda* en vivero y desarrollo de estrategias para su biocontrol.
- Swart, W. J., & Wingfield, M.J., 1991. Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* Species in South Africa. Detail 30, 40.
- Vivas, M., Zas, R., Solla, A., 2012. Screening of maritime pine (*Pinus pinaster*) for resistance to *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. Forestry. doi:10.1093/forestry/cpr055
- Volcy, C., 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología . Una revisión Genesis and evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology . A review. Genesis 26, 107–115.
- Watt, M.S., Ganley, R.J., Kriticos, D.J., Manning, L.K., 2011. species. Can. J. For. Res. doi:10.1139/X10-204
- Wikler, K., Gordon, T.R., 2000. An initial assessment of genetic relationships among populations of *Fusarium circinatum* in different parts of the world. Can. J. Bot. 78, 709–717.
- Wingfield, M.J., Hammerbacher, A., Ganley, R.J., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., Wingfield, B.D., Coutinho, T. a., 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - A growing threat to pine plantations and forests worldwide. Australas. Plant Pathol. 37, 319–334. doi:10.1071/AP08036
- Wingfield M.J., A. Jacobs, T.A. Coutinho*, R.A. and B.D.W. 2002. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. New Disease Reports 4.

VIII. ANEJOS

Tabla 4: Especies del género *Pinus* susceptibles a *Fusarium circinatum* (Wingfield *et al.* 2008).

Género Pinus	
<i>Sub-Género Pinaster</i>	<i>Sub-Género Pinus</i>
<i>Pinus canariensis</i>	<i>Pinus densiflora</i>
<i>Pinus halepensis</i>	<i>Pinus luchuensis</i>
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Pinus nigra</i>
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus sylvestris</i>
	<i>Pinus thumbergii</i>
Género Trifolius	
<i>Sub-Género Contortae</i>	<i>Sub-Género Australes</i>
<i>Pinus arizona</i>	<i>Pinus attenuata</i>
<i>Pinus coulteri</i>	<i>Pinus caribaea</i>
<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus echinata</i>
<i>Pinus douglasiana</i>	<i>Pinus elliottii</i>
<i>Pinus durnagensis</i>	<i>Pinus greggi</i>
<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus herrerae</i>
<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Pinus jaliscana</i>
<i>Pinus maximinoi</i>	<i>Pinus leiophylla</i>
<i>Pinus michoacana</i>	<i>Pinus miricata</i>
<i>Pinus pseudostrobus v. apulcensis</i>	<i>Pinus occidentalis</i>
<i>Pinus ponderosa</i>	<i>Pinus oocarpa</i>
<i>Pinus sabiniana</i>	<i>Pinus palustris</i>
<i>Pinus torreyana</i>	<i>Pinus patula</i>
<i>Pinus Sub-Género Strobis</i>	<i>Pinus pringlei</i>
<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus radiata</i>
<i>Pinus cembroides v. bicolor</i>	<i>Pinus rigida</i>
<i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Pinus serotina</i>
<i>Pinus strobus</i>	<i>Pinus taeda</i>
	<i>Pinus tecunumanii</i>
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	



Figura 9 Distribución mundial de *Fusarium circinatum* (Martínez-Álvarez, 2015).

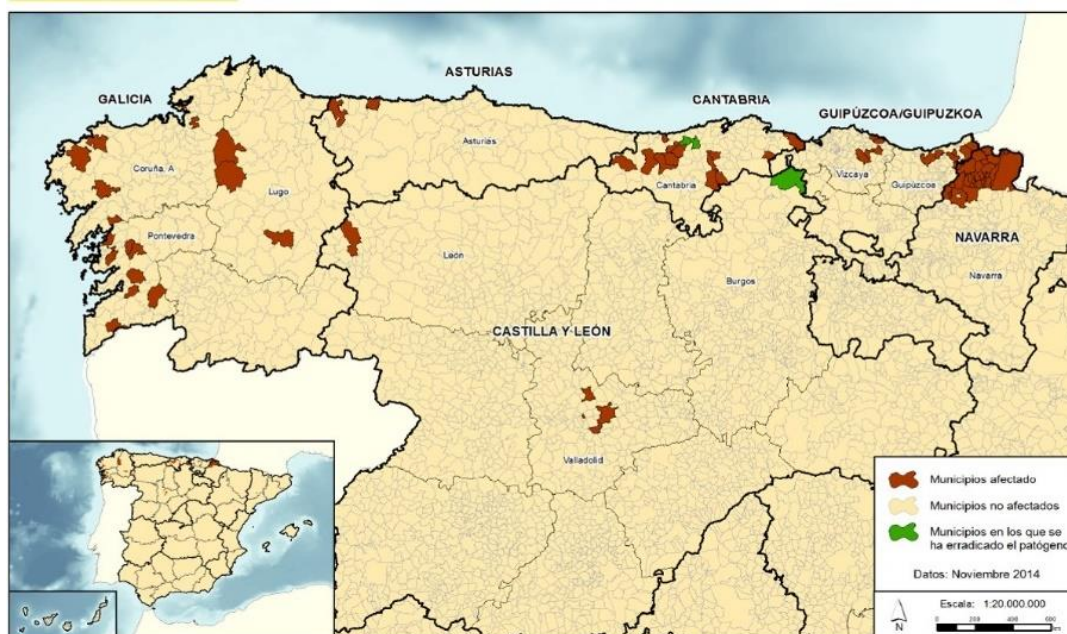


Figura 8: Distribución de *Fusarium circinatum* en España. *Fuente:* Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Noviembre 2014.

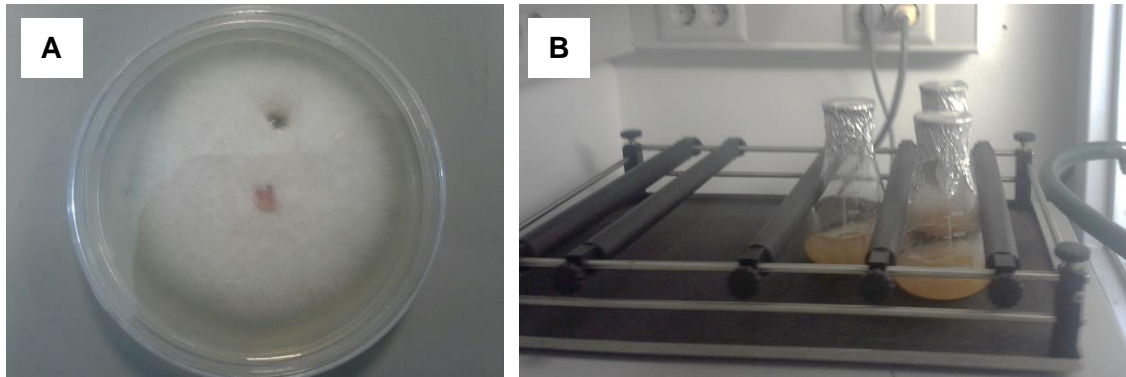


Figura 10 Aislamiento de *Fusarium circinatum*. **A)** Aislado FcCa6 creciendo en PDA. **B)** Suspensión esporal creciendo en PDB.

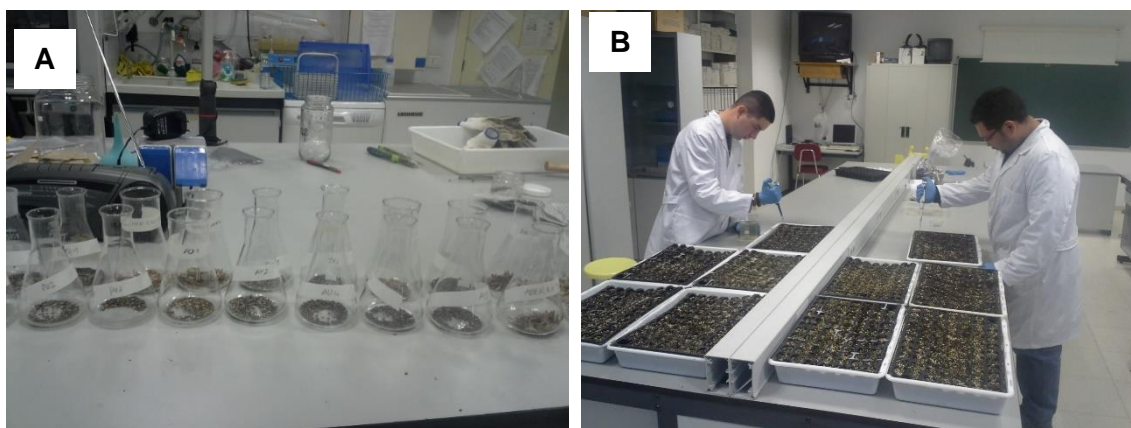


Figura 11 Preparación del ensayo. **A)** Desinfección externa de las semillas por procedencias. **B)** Inoculación de suspensión esporal de *Fusarium circinatum*.

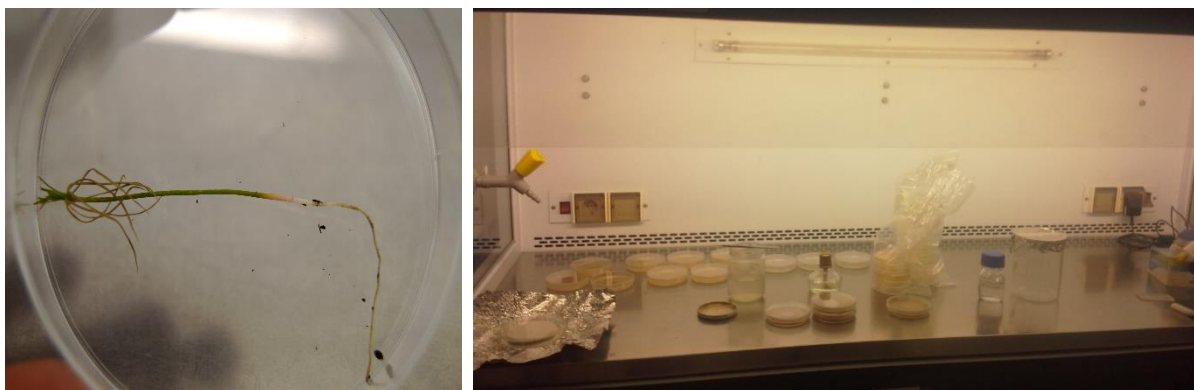


Figura 12 Re-aislamiento de *Fusarium circinatum* a partir de plántulas del ensayo de patogenicidad.

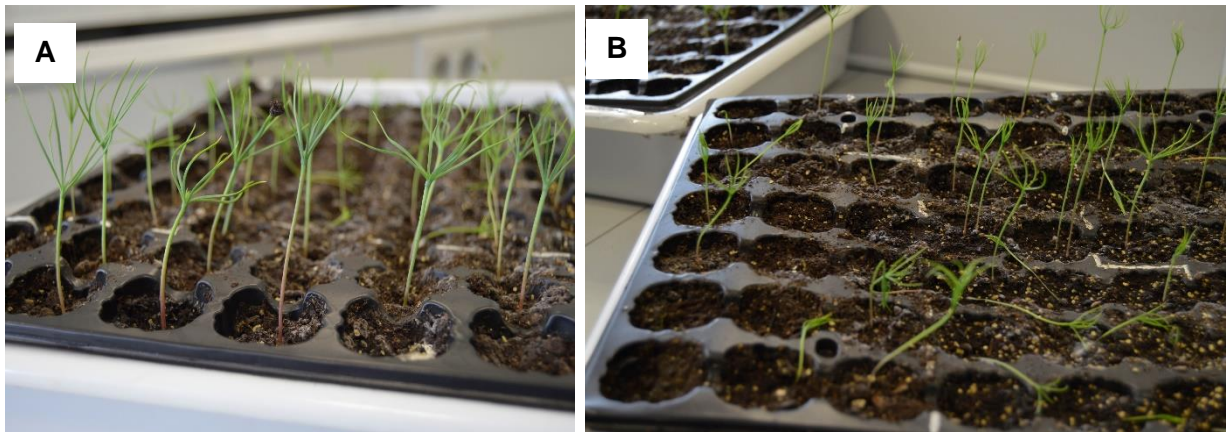


Figura 13 Comportamiento de la plántulas de *Pinus sylvestris* del ensayo de patogenicidad por procedencias. **A)** Control **B)** Inoculación con 10^3 esporas/ml.