

Desarrollo de herramientas
biotecnológicas para
el control de *Fusarium circinatum*
en viveros de *Pinus radiata*.



FONDO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA DE LA REGIÓN DEL BÍO-BÍO
CORFO **INNOVA BIO BIO**





➤ **Proyecto**
Desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de *Fusarium circinatum* en viveros de *Pinus radiata*.

➤ **Cofinancia**
Innova Bío-Bío.

➤ **Entidad Ejecutora**
Universidad de Concepción

➤ **Entidades Asociadas**
Bosques Arauco S.A.
Forestal Valdivia S.A.
Masisa Forestal S.A.
Forestal Celco S.A.
Forestal Mininco S.A.
Agrícola Los Olmos Ltda.
Vivero Los Tilos.
Controladora de Plagas Forestales (CPF).

➤ **Período de ejecución**
Noviembre 2009 – Mayo 2013

➤ **Equipo de trabajo**

Director
Eugenio Sanfuentes VS.
Ingeniero Forestal
Dr. en Fitopatología.
Universidad de Concepción

Subdirector
Homero Urrutia B.
Biólogo
Dr. en Ciencias Ambientales.
Universidad de Concepción

Investigadores
Katherine Sossa F.
Biólogo
Dra. en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.
Universidad de Concepción

José Becerra A.
Químico farmacéutico
Dr. en Ciencias Ambientales.
Universidad de Concepción

Profesionales

Asistente de investigación
Valeria Razmilic N.
Bioingeniero

Asistente de investigación
Valeria Arriagada G.
Bioingeniero

Asistente de investigación
Erwin Guzmán R.
Ingeniero en prevención de riesgo.

Técnico de laboratorio (micología)
Karina Vargas O.
Biólogo

Técnico de laboratorio (bacteriología)
Claudia Vargas A.
Químico analista

Alumna de post grado
Daniela Valdebenito R.
Bióloga
Dra (c) Estudiante Universidad de
Concepción.

Comité Técnico

Sr. Miguel Castillo S.
Ing. en Ejecución Forestal MsC.
Forestal Mininco S.A.

Sr. Luis De Ferrari F.
Ingeniero Forestal
Forestal Mininco S.A.

Sr. Osvaldo Ramírez G.
Ingeniero Agrónomo
Controladora de Plagas Forestales S.A.

Sr. Rodrigo Ahumada N.
Ingeniero Forestal MsC.
Bioforest S.A.

Sr. Carlos Ramírez De Arellano N.
Ingeniero Forestal
Masisa Forestal S.A.

Sr. Jorge López F.
Ingeniero Forestal
Vivero Los Tilos.

Sr. Uwe Pfeil H.
Ingeniero Agrónomo
Vivero Los Olmos.

Equipo de Gestión

Michelle Tobar R.
Ingeniero Comercial
Master en Administración
Universidad de Concepción

Felipe Acuña L.
Ingeniero Civil Industrial
MsC en gestión de la innovación y
emprendimiento.
Universidad de Concepción

Marco Sabag D.
Ingeniero Forestal
Universidad de Concepción

Resumen del Proyecto

La Región del Bío-Bío concentra gran parte de la producción forestal del país, tanto por la superficie plantada, como por las industrias asociadas y además, la mayor producción de plantas de *P. radiata*. Por lo tanto, actualmente es la región más afectada por la enfermedad causada por *Fusarium circinatum* y donde tendría mayor impacto en el futuro, en caso de diseminarse hacia plantaciones comerciales. Es por esta razón, y por el hecho que actualmente no existen alternativas de alta eficacia para el control de *F. circinatum*, es que las principales empresas y viveros forestales de la región del Bío-Bío y el país, participaron en el proyecto con la finalidad de desarrollar un producto de biocontrol para esta patología.

A la fecha, no existen productos registrados para el control químico de *F. circinatum*, además de presentar restricciones debido a normativas ambientales. La resistencia genética no constituye una alternativa de control a corto plazo, debido al periodo de tiempo requerido para liberar materiales resistentes con características comerciales. El control a través de manejo del cultivo, aunque presenta resultados, aún es insuficiente.

Debido a los problemas que presentan los métodos de control antes mencionados, el control biológico, a través de la utilización de microorganismos antagonistas al patógeno, es la estrategia más razonable para el control de esta enfermedad en viveros. Con el producto que se pretende desarrollar, y por evidencias obtenidas en ensayos previos en el Laboratorio de Patología Forestal (UdeC), se espera alcanzar una eficacia de control en viveros mayor a 90%, superior a otros procedimientos de control aplicados hasta el momento.



Durante el desarrollo del proyecto se logró obtener dos cepas de hongos con gran capacidad de control de *F. circinatum* en condiciones de invernadero. Además, se generó un cepario de 3.400 hongos y bacterias, y un protocolo de producción masal de los hongos de biocontrol.

Los resultados de este proyecto permitirán desarrollar un producto para el control de *F. circinatum* en los viveros de *P. radiata* del país.

Además, en el mediano plazo permitirá el desarrollo de nuevos negocios biotecnológicos relacionados con la producción, comercialización y asistencia técnica, del producto de biocontrol.



Origen del Problema

> Origen del Problema

Fusarium circinatum fue determinado en *P. radiata* en Chile el año 2001, en plantas madres aún en formación y otras ya establecidas en terreno, utilizadas para la producción de estaca en los viveros forestales. Actualmente, el patógeno se encuentra en los mayores viveros entre la Región del Libertador Bernardo O'Higgins y la Región de Los Lagos. El patógeno no se ha extendido aún a plantaciones adultas; en terreno ha sido observado en numerosas plantaciones los primeros años de establecidas las plantas y el origen de las infecciones siempre han estado asociadas a viveros desde donde fueron despachadas plantas asintomáticas, situación similar a la descrita en California y a la que se atribuye la rápida distribución de la enfermedad. En Sudáfrica, la enfermedad tenía el mismo comportamiento que en Chile, y ocurría solo en viveros de *P. patula* y luego de aproximadamente 15 años comenzó a extenderse a las plantaciones de esta especie, siendo esta situación la que podría ocurrir en Chile en los próximos años.

En el país, las pérdidas son variables entre los viveros y la enfermedad está bajo regulaciones establecidas por el Servicio Agrícola y Ganadero, que realiza muestreos periódicos en todos los viveros de pino. Las pérdidas en huertos de plantas madres han alcanzado en algunos viveros sobre el 40% de las plantas y en otros se mantuvo sobre el 20%. En producción de plantas, las pérdidas son menores pero han alcanzado hasta 14% de la producción (Figura 1 A).

Si bien las pérdidas directas de plantas en los últimos años se han reducido, el riesgo que la enfermedad se expanda a la plantación permanece. Informes indican que las pérdidas en viveros asociadas a *F. circinatum* sobrepasaron 14%, el porcentaje de predios plantados con presencia del patógeno a un año de la plantación alcanzó a 84% y cuando el máximo en el vivero alcanzó sobre 5%, el porcentaje de predios plantados con plantas de ese vivero que tuvo detección positiva alcanzó 34% (CPF 2005).

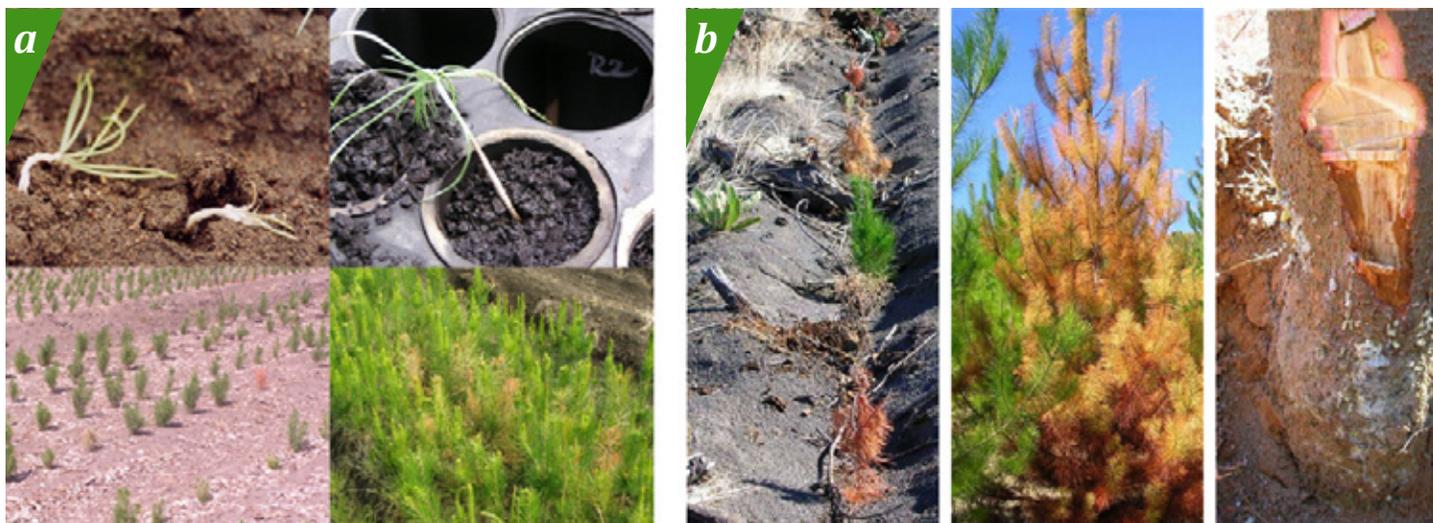


Figura 1.

Fusarium circinatum presente en los diferentes sistemas de producción de plantas de *Pinus radiata* en viveros (a) y en plantaciones causando muerte en plantas de *P. radiata* (b).

El hecho que el patógeno se determine en terreno a un año o más de la plantación, se produce por el tipo de daño que causa *F. circinatum* en plantas jóvenes, las que van a mostrar síntomas de la infección solamente cuando la lesión (o cancro) circunda el cuello de las plantas produciendo marchites y muerte (Figura 1 B). De este modo, infecciones tardías en el vivero no presentan síntoma alguno de enfermedad en el momento de la extracción y despacho de las plantas a terreno. Las plantas llevadas a terreno que presenten la enfermedad, terminan muriendo en la plantación y sobre ellas se producen las estructuras reproductivas de *F. circinatum*, con el consiguiente riesgo que el inóculo producido alcance plantaciones de mayor edad y se establezca sobre ellas en el país.

Hasta la fecha, la enfermedad se encuentra confinada a los viveros forestales, donde las medidas de manejo aplicadas corresponden principalmente a la sanitización de substratos y bandejas mediante aplicación de calor (vapor y agua caliente respectivamente) y eliminación de plantas con síntomas y/o signos de la enfermedad. No se presentan productos registrados para el control químico y no se comercializan agentes de control biológico que sean eficaces para el control de la enfermedad. Esta situación dificulta el manejo de la enfermedad en los viveros afectados. El problema causado por el patógeno en viveros de *P. radiata*, sumado al potencial de daño a las plantaciones, es que surgió la necesidad de investigar nuevas medidas de control, como el control biológico, para ser incluidas en el manejo integrado de la enfermedad.



› Objetivo General

Desarrollar un bioproducto innovador, eficaz, eficiente y ambientalmente compatible, para el control de *F. circinatum* en la producción de plantas de *P. radiata*, que permita una reducción de pérdidas económicas para el sector forestal.



› Objetivos Específicos

- 1- Seleccionar microorganismos con acción antagonica *in vitro* contra *F. circinatum*.
- 2- Obtener microorganismos eficaces para el control de *F. circinatum* en la producción de plantas de *P. radiata* en condiciones de invernadero y viveros.
- 3- Identificar y caracterizar cepas antagonistas, y determinar métodos de producción de masal.
- 4- Desarrollar formulación y protocolos de aplicación del bioproducto en viveros de *P. radiata*, para diferentes sistemas de producción de plantas.
- 5- Difusión y Transferencia Tecnológica al sector productivo forestal.



| Resultados

Resultados

1 Microorganismos con acción antagonista *in vitro* contra *F. circinatum*

Fueron obtenidas cepas de hongos (2.125) y bacterias (1.314) desde el suelo y plantas, colectadas en viveros forestales, bosques nativos y cultivos agrícolas, localizados entre las regiones del Libertador Bernardo O'Higgins y De los Ríos (Figuras 2 y 3) (Cepario de hongos y bacterias). Las cepas de hongos y bacterias fueron ensayadas en condiciones *in vitro*, y se determinó que existe una gran cantidad de cepas con diferentes grados y tipos de antagonismo contra *F. circinatum* (Figuras 4 y 5).

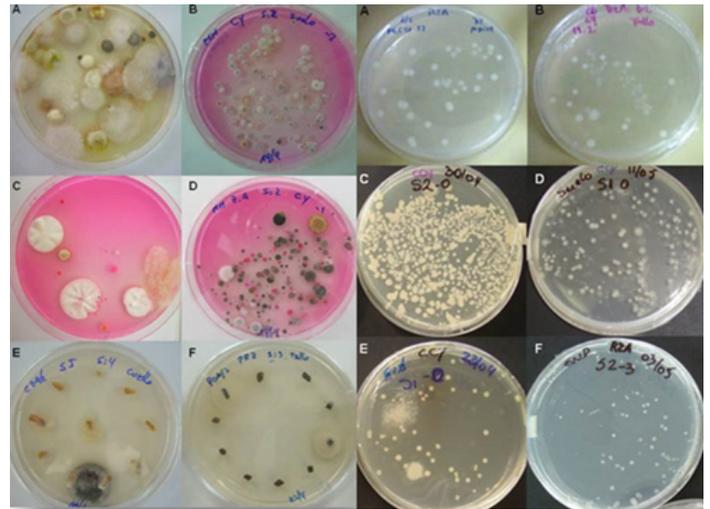


Figura 2.

Cepas de hongos y bacterias aisladas de suelo y muestras de plantas, colectadas desde diferentes ambientes.

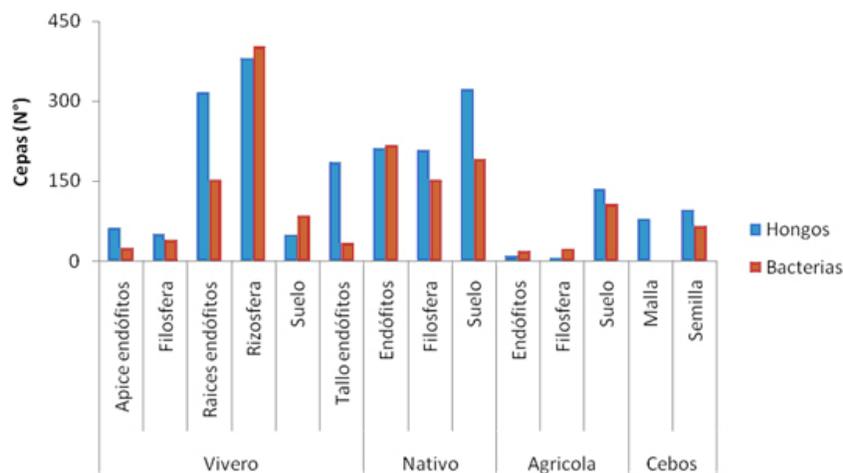


Figura 3.

Cepas de hongos y bacterias aisladas desde diferentes órganos de la planta, sustrato, cebos, recolectadas de diferentes lugares.

➤ Resultados

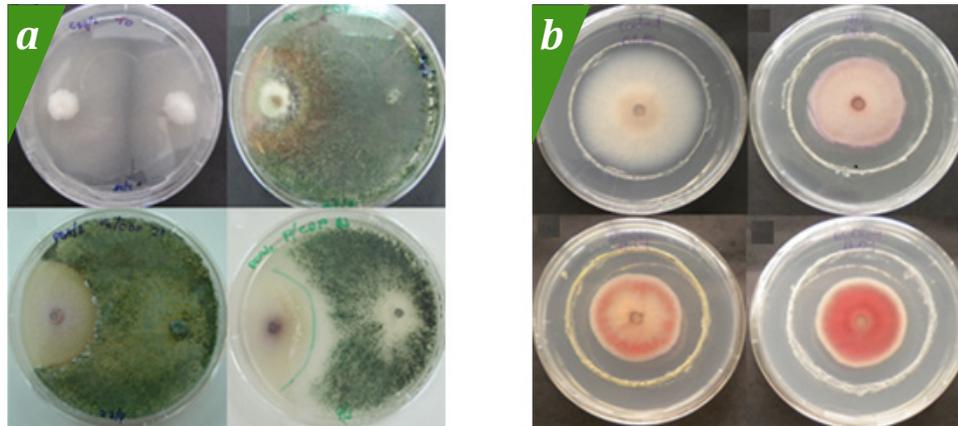


Figura 4. Ensayo *in vitro* de actividad antagonica de hongos (a) y bacterias (b) frente a *Fusarium circinatum*.

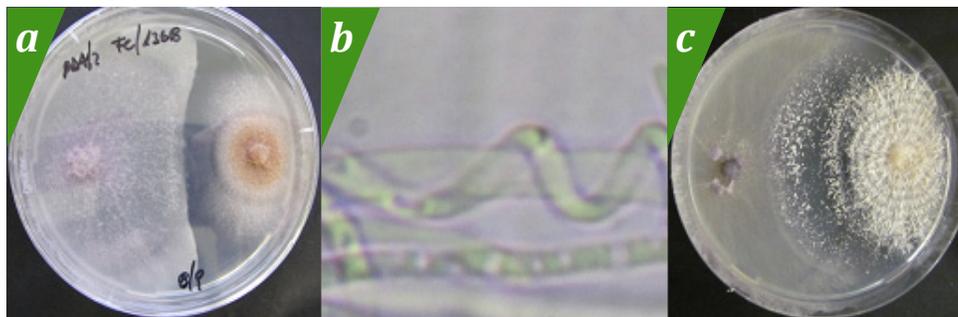


Figura 5. Diferentes tipos de actividad antagonica contra *Fusarium circinatum*. Antibiosis (a), micoparasitismo (b) y lisis de hifas (c).

2 Microorganismos eficaces para el control de *F. circinatum* en invernadero y vivero

Mediante ensayos *in vitro* fueron seleccionadas un gran número de cepas de hongos (197) y bacterias (120) con actividad antagonica contra *F. circinatum*. Las cepas fueron probadas en condiciones de invernadero, con sustrato estéril, en donde 88 cepas de hongos y bacterias alcanzaron altos niveles de control del patógeno (Figura 6, 7, 8 y 9). Los niveles de reducción de la mortalidad atribuida a *F. circinatum* alcanzó hasta 100% por parte de algunas cepas, donde 22 cepas de hongos y 9 cepas de bacterias presentaron control sobre 9 y 66%, respectivamente (Figuras 10 y 11).

A continuación, estas cepas fueron probadas en condiciones de invernadero (sustrato natural) y viveros forestales (inóculo natural del patógeno).

Resultados

En los ensayos en condiciones de invernadero con diferentes orígenes de sustrato (natural), 14 cepas de hongos y 2 de bacterias alcanzaron niveles de control sobre el 70%. En estos ensayos finales se privilegiaron mezclas de cepas las que obtuvieron resultados variables, siendo la mezcla conformado por las cepas CBF 2028, CBF 1516, CBF 1774, la que obtuvo mejores resultados en estos ensayos las que fueron testeadas en condiciones de invernadero y vivero en forma de mezclas de cepas de igual género.

En un ensayo final, la aplicación de dos cepas individualmente, una al sustrato y otra a las raíces proporcionaron 100% de control de *F. circinatum* (Figura 12).

Los resultados indican la posibilidad de utilizar cepas de hongos seleccionadas para el control de *F. circinatum* en viveros de *P. radiata*. Para el desarrollo final de producto de biocontrol es necesario concluir con la fase de formulación del producto.

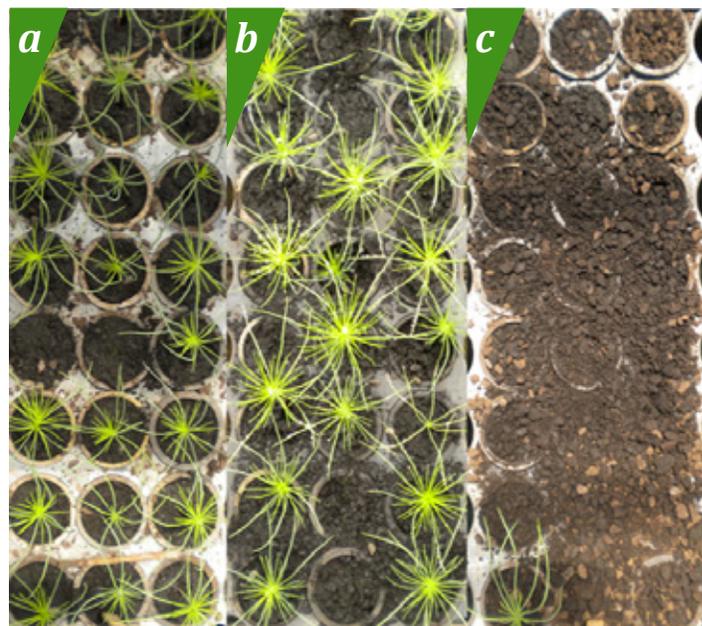


Figura 6.

Tratamientos de ensayo de invernadero, control sin patógeno (a), tratamiento con antagonista (b) y control solo con patógeno (c).

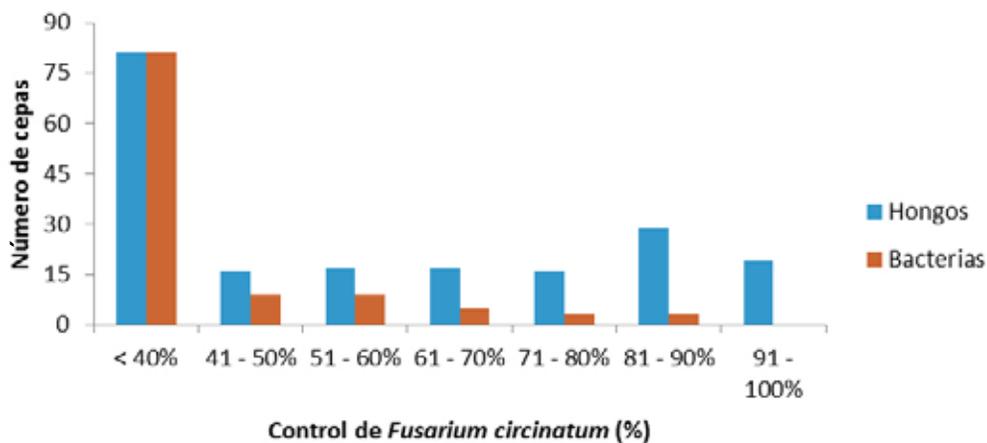


Figura 7.

Número de cepas de hongos y bacterias probadas en condiciones de invernadero, que presentan control entre 40% y 100% de *Fusarium circinatum*.

➤ Resultados

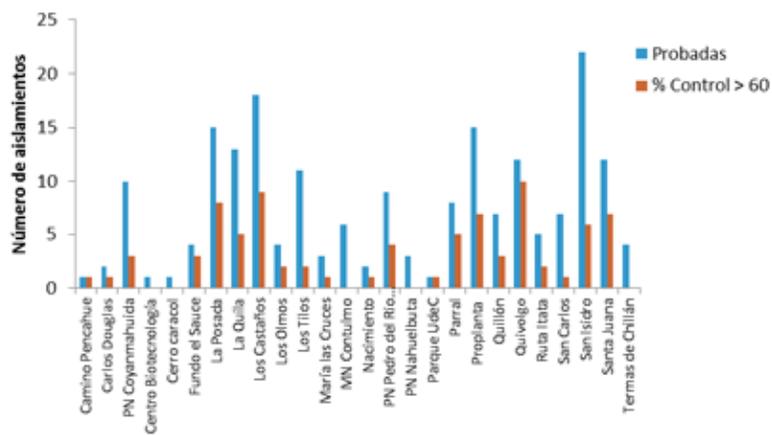


Figura 8.

Antagonistas fúngicos que presentaron control sobre 60% de *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus radiata*, de acuerdo al lugar de colecta de los aislamientos.

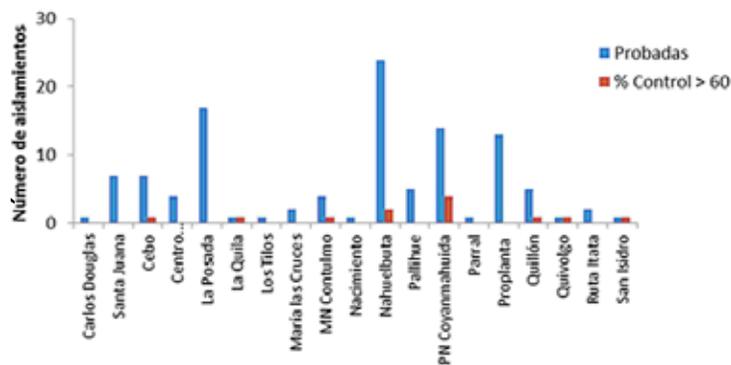


Figura 9.

Antagonistas bacterianos que presentaron control de *Fusarium circinatum* sobre 60% en plántulas de *Pinus radiata*, de acuerdo al lugar de colecta de los aislamientos.

Resultados

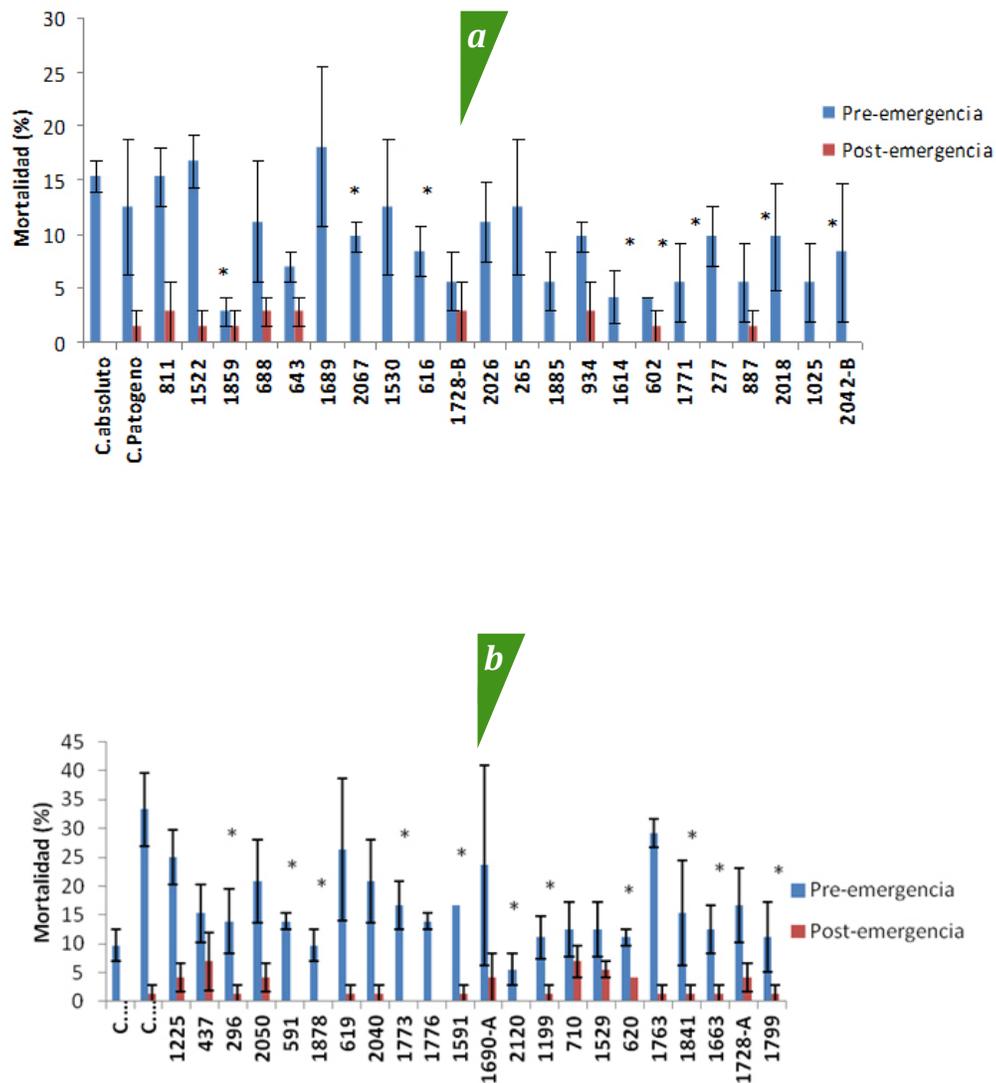


Figura 10.

Mortalidad de plántulas de *Pinus radiata* causada por *Fusarium circinatum* en ensayos 1 (A) y 2 (B) con sustrato natural, en condiciones de invernadero. *diferencias significativas para mortalidad total respecto al control patógeno.

Resultados

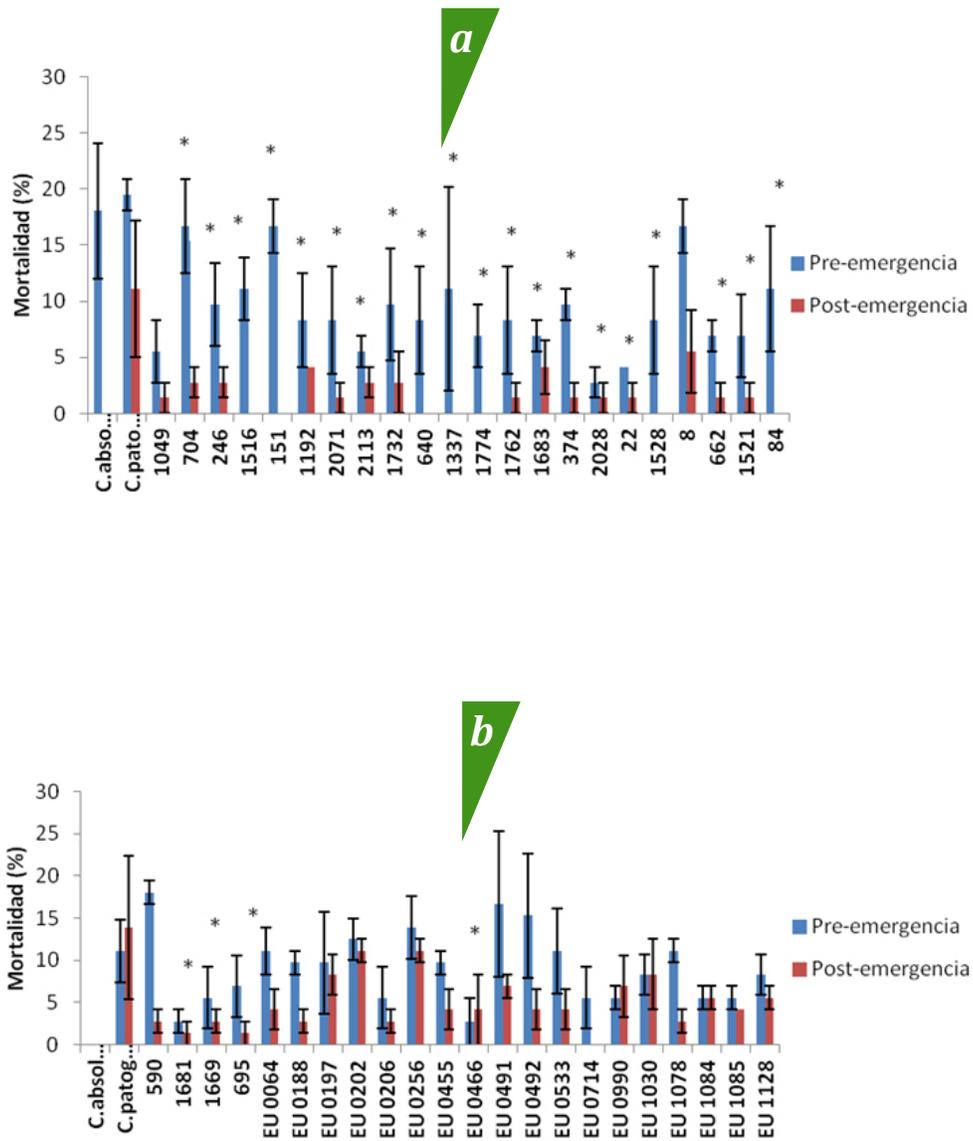


Figura 11.

Mortalidad de plántulas de *Pinus radiata* causada por *Fusarium circinatum* en cuatro ensayos, utilizando sustrato natural, y en condiciones de invernadero. *diferencias significativas para mortalidad total respecto al control patógeno.

➤ Resultados

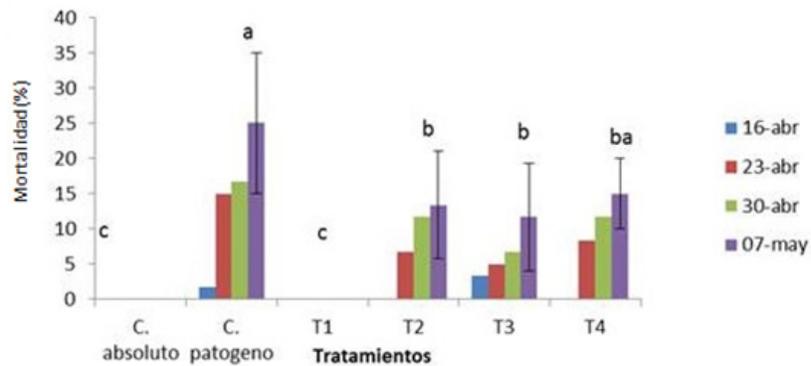


Figura 12.

Incidencia de *Fusarium circinatum* en plantas de *Pinus radiata* tratadas con diferentes combinaciones de antagonistas en sustrato natural y en raíces.

3 Cepas para biocontrol y método de producción masal

Después de los ensayos realizados, tanto *in vitro* como *in vivo* (invernadero y vivero), fueron seleccionadas un conjunto de doce cepas de hongos que obtuvieron los mejores resultado de control de *F. circinatum*, destacándose dos cepas por una mayor actividad de biocontrol (CBF 1689 y CBF 2120) (Figura 13). También, se implementó el método de producción masal de estos hongos, correspondiendo a fermentación sólida.

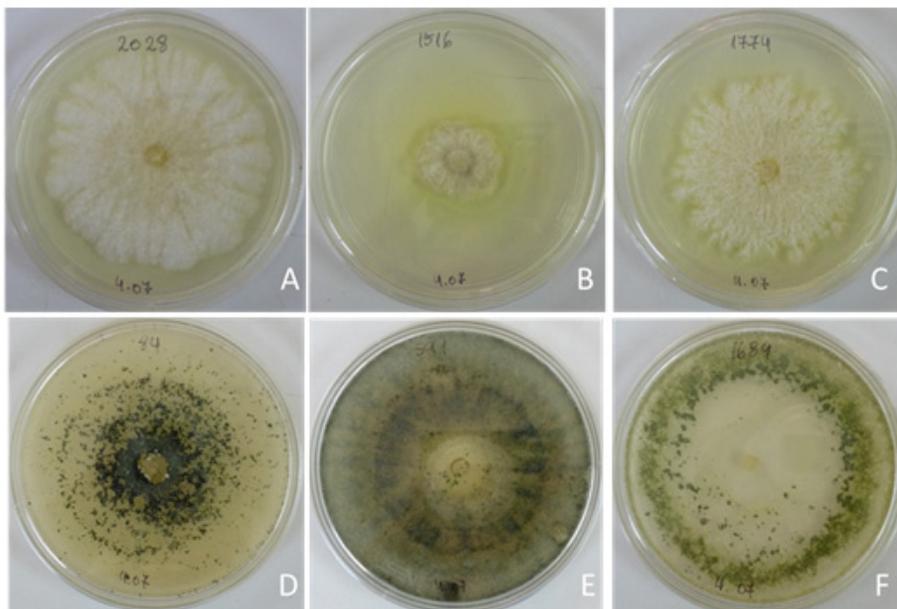


Figura 13.

Cepas con acción de biocontrol contra *Fusarium circinatum*. Cepas 591, 1689, 2026 y 2120.



FONDO DE INNOVACIÓN TECNOLÓGICA DE LA REGIÓN DEL BÍO-BÍO
CORFO **INNOVA BIO BÍO**
sueña emprende crece



Desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de *Fusarium circinatum* en viveros de *Pinus radiata*.

Laboratorio de Patología Forestal
Facultad de Ciencias Forestales-Centro de Biotecnología
Universidad de Concepción

www.udec.cl/patfor

Contacto:
Dr. Eugenio Sanfuentes VS.
esanfuen@udec.cl