

## Efecto del potencial agua y de la defensa primaria del hospedante sobre el crecimiento de *Amylostereum areolatum* y *A. chailletii*, simbiontes fúngicos de los sirícidos, y estudio de la micobiota asociada a la madera de coníferas en Patagonia, Argentina

Effect of water potential and host defense on the growth of *Amylostereum areolatum* and *A. chailletii*, fungal symbionts of siricididae, and study of wood associated mycobiota of conifers in Patagonia, Argentina

Sofía N López <sup>a,b,c,d</sup>, Alina G Greslebin <sup>a,b,c</sup>, Silvia B González <sup>b</sup>, María Belén Pildain <sup>a,c\*</sup>

\*Autor de correspondencia: <sup>a</sup> Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), Ruta 259 km4, CC14 (9200), Esquel, Argentina, mbpildain@ciefap.org.ar

<sup>b</sup> Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Argentina.

<sup>c</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

<sup>d</sup> Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva del Chubut (SCTeIP), Argentina.

### SUMMARY

*Amylostereum areolatum* and *A. chailletii* are fungal symbionts of wood-boring wasp *Sirex noctilio* and *Urocerus gigas*, respectively. *Pinus* species are susceptible to the *S. noctilio* - *A. areolatum* pathosystem, and in Patagonia, Argentina, it was found that the felled wood of *Pseudotsuga menziesii* can be attacked by *U. gigas* and its symbiont. This study evaluated the relationship of *A. areolatum*, *A. chailletii* and water potential ( $\Psi_0$ ), the primary defense of *Pinus ponderosa* and *P. menziesii*, and endophytic mycobiota associated to the wood of both conifers. The different  $\Psi_0$  were generated by variations in the osmotic potential; constitutive oleoresins of the bark and sapwood of both softwoods were extracted and characterized by GC and GC-MS and the effect of differential and majority compounds on growth of both fungi were assessed; the mycobiota was analyzed from isolates of the sapwood of healthy plants. It was observed that the growth of both fungi is significantly affected by the decrease of  $\Psi_0$  and that *A. chailletii* grew faster than *A. areolatum* under lower  $\Psi_0$ . Oleoresins had a negative effect on the growth of both fungi with no differences between conifers. *Hormonema dematioides* was the most common endophyte on *P. menziesii*; this fungus is characterized by its influence on the growth of other fungi and appears as a variable to be considered in setting of *S. noctilio* - *A. areolatum* pathosystem.

**Key words:** *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, essential oils, *Hormonema*.

### RESUMEN

*Amylostereum areolatum* y *A. chailletii* son los simbiontes fúngicos de las avispa barrenadoras de la madera *Sirex noctilio* y *Urocerus gigas*, respectivamente. Las especies de *Pinus*, son susceptibles al ataque del patosistema *S. noctilio* - *A. areolatum*, no obstante en Patagonia, se ha observado que la madera apeada de *Pseudotsuga menziesii* puede ser atacada por *U. gigas* y su simbiote. En este estudio se evaluó la relación de *A. areolatum*, *A. chailletii* y el potencial agua ( $\Psi_0$ ), la defensa primaria de *Pinus ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii*, y la micobiota endofítica asociada a ambas coníferas. Los  $\Psi_0$  se generaron por variación del potencial osmótico; se extrajeron y caracterizaron por GC y GC-MS los aceites esenciales de las oleorresinas constitutivas de la corteza y la albura de ambas coníferas y se evaluó el efecto de compuestos diferenciales y mayoritarios sobre el crecimiento de ambos hongos; la micobiota se analizó a partir de aislamientos de la albura de plantas sanas. Se observó que, el crecimiento de ambos hongos se ve significativamente afectado por el decrecimiento del  $\Psi_0$  y que *A. chailletii* creció más que *A. areolatum* en  $\Psi_0$  más bajos. Las oleorresinas tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de ambos hongos sin observarse diferencias entre compuestos diferenciales de cada conífera. *Hormonema dematioides* fue el endófito más frecuente en *P. menziesii*, ya caracterizado por su influencia sobre el crecimiento de otros hongos, se presenta como una variable a considerar en cuanto al establecimiento del patosistema *S. noctilio*- *A. areolatum*.

**Palabras clave:** *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, aceites esenciales, *Hormonema*.

### INTRODUCCIÓN

En la Patagonia argentina existen aproximadamente 100.000 ha forestadas distribuidas entre Neuquén, Río Negro y Chubut (MINAGRI 2012). La especie forestal con mayor presencia en la región corresponde a *Pinus pon-*

*derosa* Douglas ex Lawson, mientras que la segunda es *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (MINAGRI 2012). Estas especies son valiosas para la región en términos comerciales, por el rendimiento de las plantaciones, las características de su madera y la calidad de los productos que pueden obtenerse a partir de ella. Este recurso se en-

cuentra actualmente amenazado por la plaga de importancia mundial *Sirex noctilio* Fabricius y la plaga industrial *Urocerus gigas* L. Estas dos especies de la familia Siricidae son nativas de Eurasia y del Norte de África y están asociadas a hongos simbioses del género *Amylostereum*, *A. areolatum* (Fr.) Boidin y *A. chailletii* (Pers.: Fr.) Boidin, respectivamente (Slippers *et al.* 2012). El patosistema que conforman comprende una compleja interacción entre tres organismos: la avispa, el hongo simbionte degradador de la madera y el árbol hospedante (Slippers *et al.* 2012). El patosistema *S. noctilio* - *A. areolatum* es considerado el problema de mayor relevancia sanitaria en las plantaciones del género *Pinus* L., provocando la muerte de individuos bajo condiciones de estrés, no obstante se ha reportado en muy pocas oportunidades y con escasa importancia en *P. menziesii* (Haugen *et al.* 1990). En Patagonia en particular, no se han detectado problemas importantes causados por *U. gigas* - *A. chailletii* en árboles en pie pero sí en árboles apeados y en aserraderos.

Una vez que las hembras adultas de *S. noctilio* o *U. gigas* localizan un árbol susceptible, oviponen en la madera inyectando también un mucus fitotóxico y esporas fúngicas, que son transportadas en órganos especializados denominados micangios (Talbot 1977, Slippers *et al.* 2012). Estos basidiomicetes causantes de pudrición blanca, generan condiciones adecuadas de humedad y temperatura para el desarrollo de los huevos y larvas de las avispas asociadas (Coutts y Dolezal 1965) y se desarrollan degradando lignina y celulosa de la madera, liberando azúcares que sirven como fuente de nutrición para las larvas en desarrollo (Talbot 1977). Como consecuencia de la acción del hongo, de las galerías provocadas por las larvas y los orificios de salida ocasionados por las avispas, la madera queda inutilizada para su uso con fines estructurales (Talbot 1977). *Amylostereum* spp. además de ser simbioses de los sirícidos y degradar la madera de las coníferas se encuentra relacionado con dos de los biocontroladores de la plaga asociada: *Beddingia (Deladenus) siricidicola* (Bedding) Blinova y Korenchenko, nematodo que en su fase micófaga se alimenta de cultivos jóvenes de *Amylostereum* y sólo se reproduce en presencia de *A. areolatum*; e *Ibalia leucospoides* Hochenwald, ya que las hembras de este parasitoide se sienten atraídas hacia los agujeros de oviposición de *S. noctilio* por los compuestos volátiles producidos por *A. areolatum* (Slippers *et al.* 2012).

*Amylostereum* spp., las avispas, los hospedantes y los biocontroladores son organismos estrechamente asociados y, como tales, existen diferentes factores microambientales y de competencia con otros organismos que pueden influir o alterar sus interacciones. Estudios sobre las estrategias de competencia entre hongos asociados a insectos demuestran que la competencia primaria y el  $\Psi_0$  influyen el resultado de las interacciones y, por lo tanto, pueden tener importantes consecuencias en el éxito de la asociación insecto - hongo (Bleiker y Six 2009). Además, particularmente para el patosistema *S. noctilio* - *A. areolatum*, se

ha demostrado que la resistencia de *Pinus radiata* D. Don al ataque de *S. noctilio* está relacionada con el contenido de humedad de la madera y que la mayor eficiencia en el proceso de inoculación del biocontrolador *B. siricidicola* se obtiene en aquellas secciones del fuste del árbol donde las condiciones de humedad son intermedias (Talbot 1977, Hurley *et al.* 2012). Este no es el único factor que influye sobre el desarrollo del patosistema, se ha determinado que el sistema de defensa primario de las coníferas, compuesto por el sistema de oleorresinas, es el principal mecanismo de resistencia contra la invasión de insectos y patógenos (Paine y Hanlon 1994). Las oleorresinas son una mezcla de resinas y aceites esenciales (Bandoni 2000) cuyas composiciones químicas y propiedades físicas son una característica diferencial entre las especies de *Pinus* (Hodges *et al.* 1979). El flujo de resina es una de las primeras respuestas observables por parte del hospedante al ataque de *S. noctilio* y *A. areolatum*. Si bien el efecto de las oleorresinas sobre el crecimiento de *A. areolatum* está bien caracterizado para *P. radiata*, donde  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno son los componentes volátiles causantes de la inhibición del crecimiento de *A. areolatum* (Kile y Turnbull 1974), no se conoce cuál es el efecto de oleorresinas de otras coníferas sobre el crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii*.

Otro factor que estaría involucrado en este patosistema, es la presencia de endófitos fúngicos en la albura de la madera que podrían competir con *A. areolatum* por los recursos, afectando de esta manera a las interacciones entre la plaga, el hospedante y los biocontroladores. Esta hipótesis se basa en el hecho que la competencia por los recursos entre hongos que conviven en el mismo sustrato es bien conocida, y envuelve la captura primaria del recurso o combate, donde los recursos ya colonizados son capturados y defendidos (Boddy 2000). Los hongos manchadores de la madera se encuentran frecuentemente presentes en los árboles infestados por *S. noctilio*, por consiguiente, estos hongos y *A. areolatum* necesitarían competir por el mismo recurso (Hurley *et al.* 2012). Además de la presencia de hongos manchadores, es muy poco lo que se conoce en relación a la microbiota presente en la madera y raíces de las coníferas. Los trabajos de Hoff *et al.* (2004) y Goetz (2006) han reportado listas de géneros fúngicos de referencia a partir de estudios en *P. ponderosa* y *P. menziesii* en Estados Unidos pero no existen trabajos similares para el sur de Sudamérica que permitan realizar comparaciones.

En este estudio se plantean como hipótesis de trabajo que el potencial agua ( $\Psi_0$ ) y los aceites esenciales de las resinas constitutivas de las coníferas afectan de manera diferencial el crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii* y que la microbiota asociada a la albura de *P. menziesii* es diferente a la de *P. ponderosa*. Como objetivos específicos se plantearon los siguientes: (1) estudiar la relación de *A. areolatum* y *A. chailletii* con el potencial agua, (2) estudiar el efecto de la defensa primaria de *P. ponderosa* y *P. menziesii* sobre *A. areolatum* y *A. chailletii*, y (3) caracterizar la microbiota endofítica asociada a estas especies de

coníferas, aportando al conocimiento sobre el sistema *Sirex* y *Urocerus* - *Amylostereum* y plagas forestales en general.

## MÉTODOS

*Cepas fúngicas.* Las cepas utilizadas en los estudios *A. areolatum* (J10) y *A. chaillietii* (Trv-Ch), fueron aisladas de *P. ponderosa* y *P. menziesii*, respectivamente. Ambos cultivos se encuentran depositados en el cepario del Área de Protección Forestal del CIEFAP. En todos los ensayos se utilizaron las mismas cepas ya que un estudio de diversidad genética corroboró la presencia de un único linaje clonal en la región (Pildain y Rajchenberg 2011).

*Ensayo 1. Efecto del potencial agua sobre el crecimiento de Amylostereum areolatum y A. chaillietii.* Los medios de cultivo con los diferentes potenciales agua utilizados para los ensayos de crecimiento se basaron en métodos previamente publicados (Whiting y Rizzo 1999). Se preparó extracto de malta y agar (MEA: 15 g L<sup>-1</sup> agar, 20 g L<sup>-1</sup> extracto de malta) como medio base y se modificó con el agregado de sacarosa y cloruro de potasio (KCl) para obtener 8 potenciales osmóticos distintos: 0 (MEA sin aditivos), -1,5 (20,4 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2,48 g L<sup>-1</sup> de KCl), -3 (40,88 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 4,92 g L<sup>-1</sup> de KCl), -6 (81,72 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 9,84 g L<sup>-1</sup> de KCl), -9 (122,56 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 15,84 g L<sup>-1</sup> de KCl), -12 (163,44 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 19,68 g L<sup>-1</sup> de KCl), -15 (204,28 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 24,6 g L<sup>-1</sup> de KCl) y -18 (245,16 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 29,52 g L<sup>-1</sup> de KCl) en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Las placas se inocularon en el centro con un disco de 0,5 cm de diámetro de medio extracto de malta, levadura y agar (MYA: 20 g L<sup>-1</sup> de extracto de malta, 2 g L<sup>-1</sup> de levadura, 15 g L<sup>-1</sup> de agar) colonizado con micelio de *A. areolatum* y *A. chaillietii* de cultivos de dos semanas de edad, según correspondiera y se incubaron en oscuridad en cámara de crecimiento a 22 °C durante cuatro semanas. Se realizaron 15 réplicas de cada tratamiento para cada hongo. A partir del segundo día de incubación, y cada dos días, se midió el crecimiento radial del micelio en cuatro direcciones durante 20 días. Para esta determinación se utilizó lupa estereoscópica, marca Zeiss, modelo Stemi SV11 40X con luz incorporada.

*Ensayo 2. Influencia de la fracción volátil de las oleorresinas de Pinus ponderosa y Pseudotsuga menziesii sobre el crecimiento de Amylostereum areolatum y A. chaillietii.*

*Ensayo 2.1.* Para evaluar el posible efecto de la fracción volátil de las oleorresinas (aceites esenciales) sobre el crecimiento fúngico se extrajo la fracción volátil de oleorresinas de la corteza y albura de troncos de *P. ponderosa* y *P. menziesii* recientemente apeados (de un representante de cada especie). La extracción se realizó por hidrodestilación utilizando una trampa tipo Clevenger (Council of Europe, 1997) y se analizó su composición por GC y GC-MS, em-

pleando un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus 500 con una configuración especial (Retta *et al.* 2009). Se prepararon placas de Petri de 5 cm de diámetro con MEA y se colocaron 0,035 mL de los extractos de los aceites esenciales sobre toda la superficie de las placas utilizando un ansa de Digralsky para homogeneizar la dispersión de cada extracto. Luego se inocularon con discos de 0,5 cm de diámetro de MYA con micelio fúngico y se colocaron en cámara de crecimiento durante 30 días. Se utilizaron placas de Petri sin aceites esenciales como testigo y se realizaron 11 réplicas de cada tratamiento. Se midió el crecimiento fúngico en cuatro direcciones cada dos días hasta que el crecimiento del testigo alcanzó el borde de la placa de Petri. Se utilizó la lupa estereoscópica descrita previamente.

*Ensayo 2.2.* Para determinar el efecto individual de los compuestos volátiles sobre el crecimiento de los hongos estudiados, se utilizó la metodología propuesta por Lu *et al.* (2010). Se colocó un disco de 0,5 cm de MYA colonizado con crecimiento activo de las especies de *Amylostereum* analizadas en el centro de placas de Petri de 5 cm de diámetro con MEA. A partir del análisis de la composición de los aceites esenciales obtenidos en el ensayo anterior se seleccionaron los compuestos mayoritarios para *P. ponderosa* (Pp) y *P. menziesii* (Pm): limoneno (Pm),  $\alpha$ -pineno (Pp-Pm),  $\beta$ -pineno (Pp-Pm),  $\delta$ -3 careno (Pp-Pm) y diferenciales metil chavicol (4-alilanisol) (Pp), hidrato de sabineno (Pm), 4-carvomentenol (terpinen-4-ol) (Pm), acetato de citronelilo (Pm), citronelol (Pm),  $\rho$ -cimen-8-ol ( $\rho$ - $\alpha$ , $\alpha$ -trimetil benzil alcohol) (Pp). Los compuestos comerciales fueron adquiridos en condiciones de alta pureza (95 %, 98 %, 99 %, 90 %, 98,5 %, 97 %, 92 %, 95 %, 90 % respectivamente) a la empresa Sigma - Aldrich. Se colocó 0,5 mL de cada compuesto sobre papel de filtro estéril de 5,5 cm de diámetro pegado en la tapa de las placas de Petri (excepto  $\alpha$  y  $\beta$ -Pineno de los cuales se utilizó 0,25 mL, metil chavicol del que se utilizó 0,1 mL e hidrato de sabineno del cual se utilizó 0,06 mL). El hidrato de sabineno fue el único compuesto que se encontraba en estado sólido, los 500 mg del producto fueron disueltos con 2 mL de etanol. Se realizaron dos controles uno con papel de filtro solo y otro con etanol. Se efectuaron cinco réplicas por tratamiento que fueron incubados en cámara de crecimiento durante 30 días. Se midió el crecimiento fúngico en cuatro direcciones cada dos días hasta que el testigo alcanzó el borde de la placa de Petri. Se utilizó lupa estereoscópica descrita anteriormente.

*Ensayo 3. Análisis de la microbiota asociada a la madera de Pinus ponderosa y Pseudotsuga menziesii.* De cada conífera estudiada, se seleccionaron 29 individuos (con DAP > 20 cm) de tres sitios diferentes (42° 53' 31,86" S, 71° 20' 16,41" O; 43° 07' 32,84" S, 71° 33' 17,37" O y 42° 59' 59,56" S, 71° 24' 66" O), se tomó de cada uno un tarugo del tercio medio del fuste con un barreno de incremento previamente esterilizado de 0,5 cm de diámetro. Los tarugos obtenidos se colocaron en bolsas individuales estériles

y se trasladaron al laboratorio donde fueron esterilizados superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 3 % durante 30 segundos. Se cortaron cuatro discos de 0,5 cm de largo de cada tarugo y se colocaron en placas de Petri con MEA. Las placas se colocaron en cámara de crecimiento y se realizaron aislamientos de aquellos hongos que crecieron a partir de la madera. La identificación de la microbiota se realizó hasta el nivel de género de acuerdo a las características observadas en cultivo, bajo lupa estereoscópica y con microscopio óptico marca Zeiss, modelo Standard 20 100X con luz incorporada, utilizando la bibliografía de Carmichael *et al.* (1980) y Wang y Zabel (1990). No se tuvieron en cuenta a los contaminantes comunes. Las cepas fueron conservadas en viales con agua destilada estéril en heladera a 4 °C y se establecieron las frecuencias relativas para cada uno de los géneros.

Sobre el aislamiento más frecuente (*Hormonema* sp. Lagerb. *et Melin*) se efectuó una identificación morfológica y genotipificación molecular. La extracción de ADN genómico se obtuvo a partir de cultivo en medio líquido en malta-peptona (10 g L<sup>-1</sup> de extracto de malta Merck, Darmstadt y 0,1 g L<sup>-1</sup> de bacto peptona, Difco, Detroit, MI), con 2 mL de medio en tubos de 15 mL, en oscuridad durante siete días. El ADN fue extraído usando el equipo Ultra Clean TM Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA). Se amplificó la región del ADN ITS (*Internal Transcribed Spacer region*) utilizando los primers universales ITS1 e ITS4. La reacción de amplificación por PCR de la región ITS se realizó incluyendo dNTPs (0,25 mM de c/u), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer de PCR que acompaña a la enzima polimerasa, 0,1 mM de cada primer, 100 ng de DNA y 1,25 U de GoTaq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). El volumen final de la reacción fue de 50 mL. La reacción se llevó a cabo en termociclador (My Cycler, BioRad, Hercules, CA) y las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 94 °C (2 min), seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C (1 min), *primer annealing* a 56 °C (30 segundos) y elongación a 72 °C (1 min). Un paso final de elongación a 72 °C (10 min) fue agregado. El producto de la PCR fue visualizado y separado en un gel de agarosa 1 % (peso/volumen) con GelRed™ (Bioitum Inc.) como intercalante y las bandas fueron visualizadas bajo luz UV. El fragmento amplificado fue purificado y secuenciado en un secuenciador automático (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) en la empresa Macrogen (Seúl, Corea). El número de acceso de GenBank es KC561093. La búsqueda de la identidad de la secuencia obtenida fue realizada en *GenBank DNA database* usando el algoritmo de búsqueda *Gapped BlastN* (Altschul *et al.* 1997).

**Análisis estadístico.** Para los ensayos 1 y 2 se realizó un análisis de la varianza (ANDEVA) con medidas repetidas utilizando el programa SPSS statistics 17.0. Se realizaron *a posteriori* los contrastes multivariados con la prueba LSD considerando que se rechaza la hipótesis nula cuando

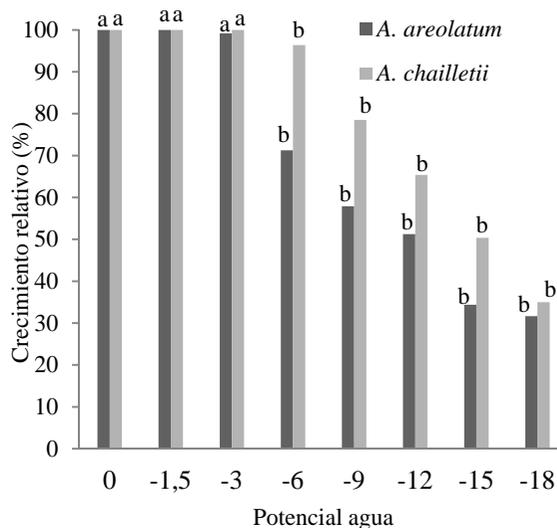
el valor de  $P \leq 0,05$ . Para todos los análisis se corroboró que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad con Infostat versión 2011. Para el ensayo 3, se realizó un análisis estadístico no paramétrico. Para estudiar una posible asociación entre la frecuencia observada del hongo mayoritario y la especie de conífera se realizó una prueba  $\chi^2$  y el coeficiente de Cramer para medir fuerza de asociación utilizando el programa SPSS Statistics 17.0.

## RESULTADOS

**Ensayo 1. Efecto del potencial agua sobre el crecimiento de *Amylostereum areolatum* y *A. chailletii*.** El crecimiento de ambos hongos fue significativamente afectado por los diferentes potenciales agua ( $\Psi_0$ ) en interacción con el tiempo de duración del ensayo, decreciendo proporcionalmente con la disminución del  $\Psi_0$ .

Los medios con potenciales hídricos -6, -9, -12, -15 y -18 redujeron el crecimiento de *A. areolatum* en 28,66 %, 42,05 %, 48,59 %, 65,73 % y 68,22 % respectivamente. Mientras que en el crecimiento de *A. chailletii* los medios con potenciales hídricos -6, -9, -12, -15 y -18 retrasaron el crecimiento en un 2,5 %, 21,5 %, 34,75 %, 49,75 % y 65 %, respectivamente (figura 1).

Comparando el efecto del  $\Psi_0$  sobre ambos hongos, se observó que el crecimiento de *A. areolatum* fue más retrasado por los  $\Psi_0$  más bajos que el de *A. chailletii*, pero no se observaron diferencias en el crecimiento de ambas especies en los  $\Psi_0$  más altos (-1,5 y -3). *Amylostereum chailletii* alcanzó el límite de crecimiento (borde de la placa) hasta



**Figura 1.** Crecimientos relativos de *A. areolatum* y *A. chailletii* en los diferentes potenciales agua al final del ensayo (20 días). Letras distintas para diferentes tratamientos indican diferencias significativas (LSD,  $P < 0,05$ ) en el crecimiento de cada uno de los hongos con respecto a su control ( $\Psi_0$ ).

Relative growth of *A. areolatum* and *A. chailletii* on eighth media of different water potential over a 20 day time-period.

el  $\Psi_0$  -12 y además aún en los potenciales más bajos creció más que *A. areolatum* (cuadro 1).

*Ensayo 2. Influencia de la fracción volátil de las oleorresinas de Pinus ponderosa y Pseudotsuga menziesii sobre el crecimiento de Amylostereum areolatum y A. chailletii.*

*Ensayo 2.1.* El crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii* fue afectado negativamente ( $P < 0,0001$ ) por la presencia de la fracción volátil de las oleorresinas de las coníferas estudiadas, se detectaron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) en el crecimiento de los dos hongos en los diferentes tratamientos y también en los diferentes tiempos (para *A. areolatum*:  $F_{13,560} = 104,23$ ,  $P < 0,0001$  y para *A. chailletii*  $F_{13,538} = 106,45$ ,  $P < 0,0001$ ).

En el caso de *A. areolatum* se observó que el control alcanzó crecimiento límite (el límite de la placa) el día 17, mientras que, en ese día, en presencia de los aceites esenciales de *P. ponderosa* y *P. menziesii* tuvo un retraso en su crecimiento del 86,52 % y 85,28 %, respectivamente. En cuanto a *A. chailletii*, se observó que en ausencia de los aceites esenciales alcanzó su crecimiento límite el día 10, ese día, en presencia de los aceites esenciales de *P. ponderosa* y *P. menziesii* tuvo un retraso del 97,1 % y 92,36 %, respectivamente.

Comparando ambos hongos se observó que los aceites esenciales de la madera de ambas coníferas afectaron de manera diferencial el crecimiento de los hongos estudiados. *Amylostereum areolatum* presentó un mayor retraso en su crecimiento en presencia de los aceites esenciales de ambas especies de coníferas que *A. chailletii* (figura 2).

*Ensayo 2.2.* De los análisis de compuestos volátiles producidos por ambos hospedantes se desprende que  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\delta$ -3-careno fueron comunes a ambas coníferas, mientras que limoneno, citronelol, acetato de citronelilo, hidrato de sabineno y 4-carvomentenol solo fueron producidos por *P. menziesii* (Pm) y  $p$ -cimen-8-ol y metil chavicol (4-alilanol) por *P. ponderosa* (Pp). En general, el crecimiento de los hongos en presencia de los compuestos mostró un gradiente de alteración desde aquellos que inhibieron totalmente el crecimiento hasta aquellos que lo retrasaron en el tiempo y en las condiciones planteadas para este ensayo.

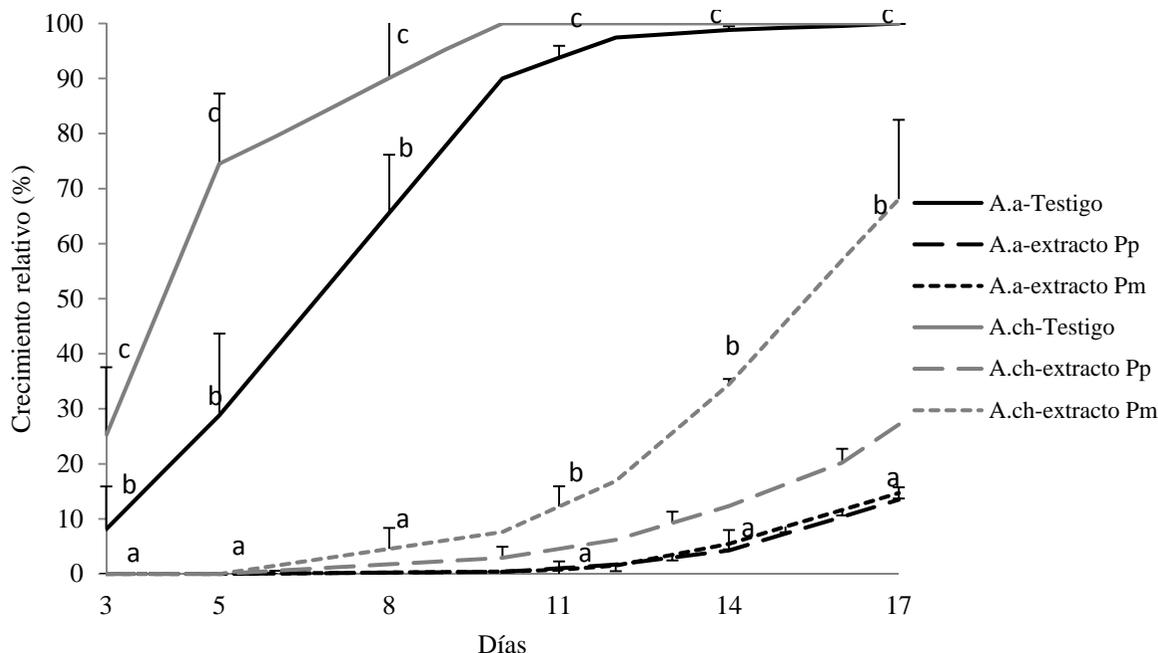
Los compuestos  $p$ -cimen-8-ol (Pp), citronelol (Pm), hidrato de sabineno (Pm) y 4-carvomentenol (Pm) inhibieron por completo el crecimiento de ambos hongos. Mientras que limoneno (Pm),  $\alpha$ - pineno (Pp, Pm),  $\beta$ - pineno (Pp, Pm),  $\delta$ -3-careno (Pp, Pm), metil chavicol (Pp) y acetato de citronelilo (Pm) retrasaron el crecimiento. *Amylostereum areolatum* alcanzó su crecimiento límite (borde de la placa) hacia el final del ensayo en los tratamientos con  $\alpha$ - pineno y  $\beta$ - pineno y *A. chailletii* lo hizo sólo en el tratamiento con  $\alpha$ - pineno, aunque no se puede comparar la velocidad de crecimiento con respecto a los otros compuestos ya que el volumen que se utilizó para estos fue menor que para el resto (1,25 % y 2,5 % V/V, respectivamente). Al finalizar el ensayo, el crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii* fue retrasado en los tratamientos con limoneno (Pm), acetato de citronelilo (Pm),  $\delta$ -3-careno (Pp, Pm) y metil chavicol (Pp) (cuadro 2 y figura 3). Mientras que el de *A. chailletii* lo fue en los tratamientos con  $\beta$ - pineno (Pp, Pm), acetato de citronelilo (Pm), limoneno (Pm),  $\delta$ -3-careno (Pp, Pm) y metil chavicol (Pp) (cuadro 2 y figura 3).

**Cuadro 1.** Media ( $\pm$  desviación estándar) de crecimiento (en cm) de *Amylostereum areolatum* (*A. a*) y *A. chailletii* (*A. ch*) durante 20 días a diferentes potenciales agua.

Mean mycelial growth of *Amylostereum areolatum* (*A. a*) and *A. chailletii* (*A. ch*) (average  $\pm$  SD) under different water potential over a 20 day time-period.

Días	Potencial agua ( $\psi_0$ )							
	0		-1,5		-3		-6	
	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>
8	1,3 $\pm$ 0,64a	1,43 $\pm$ 0,24b	1,0 $\pm$ 0,42a	1,88 $\pm$ 0,34b	1,07 $\pm$ 0,4a	1,24 $\pm$ 0,22b	0,6 $\pm$ 0,33a	1,1 $\pm$ 0,38b
13	2,1 $\pm$ 0,77a	2,84 $\pm$ 0,30b	1,9 $\pm$ 0,67a	3,6 $\pm$ 0,21b	1,86 $\pm$ 0,5a	2,60 $\pm$ 0,52b	1,2 $\pm$ 0,39a	2,1 $\pm$ 0,49b
20	3,2 $\pm$ 0,78a	4b	3,36 $\pm$ 0,84a	4b	3,2 $\pm$ 0,7a	4b	2,3 $\pm$ 0,49a	3,9 $\pm$ 0,35b
Días	Potencial agua ( $\psi_0$ )							
	-9		-12		-15		-18	
	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>	<i>A. a</i>	<i>A. ch</i>
8	0,40 $\pm$ 0,22a	0,73 $\pm$ 0,26b	0,40 $\pm$ 0,26a	0,59 $\pm$ 0,3b	0,17 $\pm$ 0,2a	0,34 $\pm$ 0,15b	0,19 $\pm$ 0,22a	0,10 $\pm$ 0,10b
13	0,88 $\pm$ 0,3a	1,56 $\pm$ 0,33b	0,87 $\pm$ 0,35a	1,44 $\pm$ 0,3b	0,50 $\pm$ 0,26a	0,86 $\pm$ 0,29b	0,51 $\pm$ 0,29a	0,38 $\pm$ 0,21b
20	1,86 $\pm$ 0,5a	3,14 $\pm$ 0,36b	1,65 $\pm$ 0,43a	2,61 $\pm$ 0,3b	1,10 $\pm$ 0,37a	2,01 $\pm$ 0,28b	1,02 $\pm$ 0,30a	1,40 $\pm$ 0,24b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre el crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii* para cada uno de los potenciales agua evaluados ( $\psi_0$ ).



**Figura 2.** Curva de crecimiento relativo de *Amylostereum areolatum* y *A. chailletii* en ausencia (testigo) o presencia de aceites esenciales de *Pinus ponderosa* (Pp) y *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Letras distintas para diferentes tratamientos en un mismo tiempo indican diferencias significativas (LSD,  $P < 0,05$ ) en el crecimiento.

Relative growth curve of *A. areolatum* and *A. chailletii* in absence (control) or presence of essential oils from *Pinus ponderosa* and *Pseudotsuga menziesii*.

**Cuadro 2.** Porcentajes de reducción del crecimiento de *Amylostereum areolatum* y *A. chailletii* en presencia de los compuestos de la fracción volátil de las oleoresinas (\*provenientes de *Pinus ponderosa*, # provenientes de *Pseudotsuga menziesii*).

Growth reduction of *A. areolatum* and *A. chailletii* in presence of isolated compounds of constitutive oleoresins of the bark and sapwood (\*from *Pinus ponderosa*, # from *Pseudotsuga menziesii*).

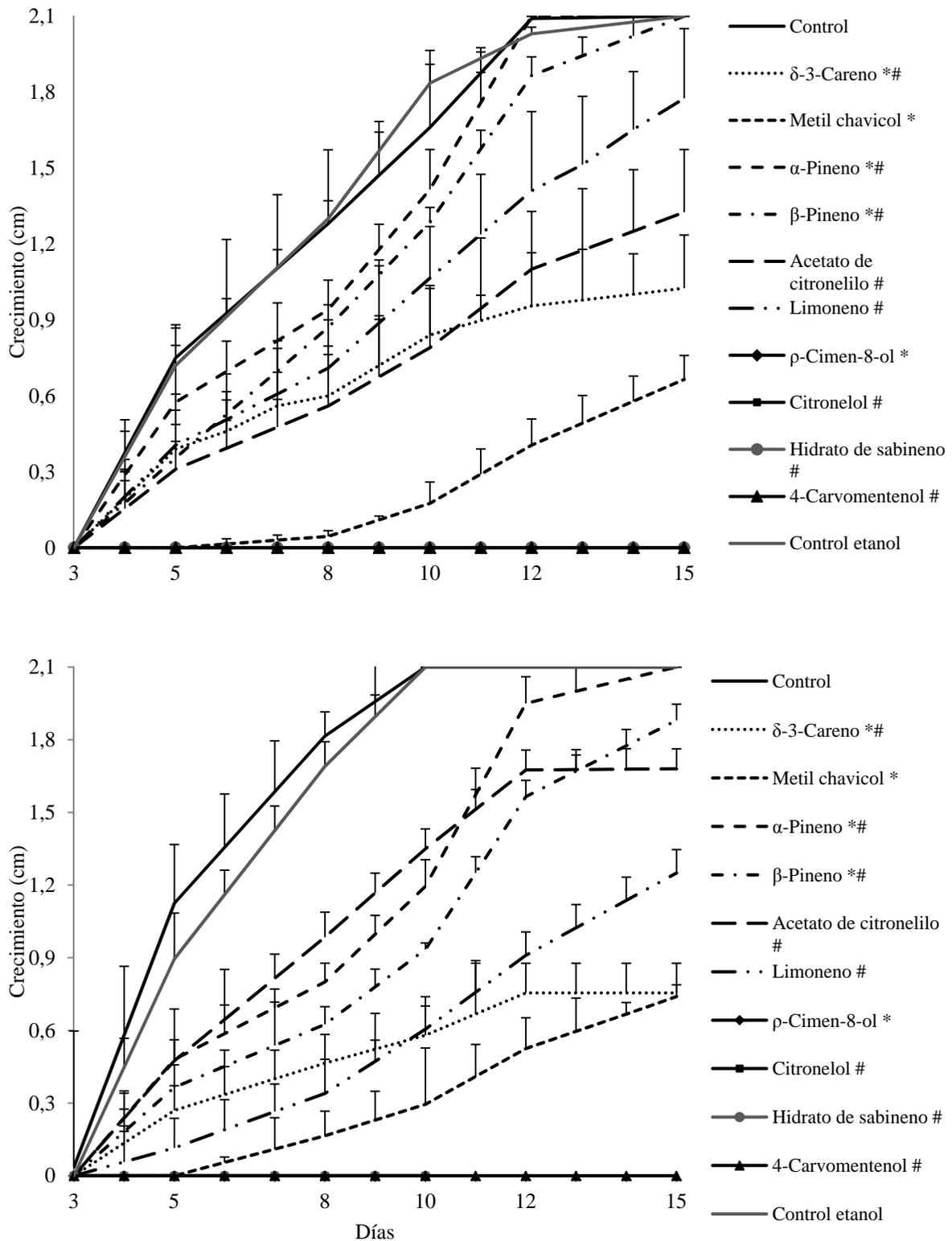
Compuesto	% de reducción de crecimiento	
	<i>A. areolatum</i>	<i>A. chailletii</i>
Limoneno #	15,48	40,47
$\alpha$ - pineno *#	0	0
$\beta$ - pineno *#	0	10,47
$\delta$ -3-careno *#	51,2	64
Acetato de citronelilo #	36,9	20
Metil chavicol *	68,34	64,76
$\rho$ -cimen-8-ol *	100	100
Citronelol #	100	100
Hidrato de sabineno #	100	100
4-carvomentenol #	100	100

Comparando el crecimiento de *A. areolatum* y *A. chailletii*, en el tiempo en que los controles alcanzaron su límite de crecimiento (15 días el primero y 10 días el segundo) se desprende que en ambos casos los compuestos  $\rho$ -cimen-8-ol (Pp), citronelol (Pm), hidrato de sabineno (Pm) y 4-car-

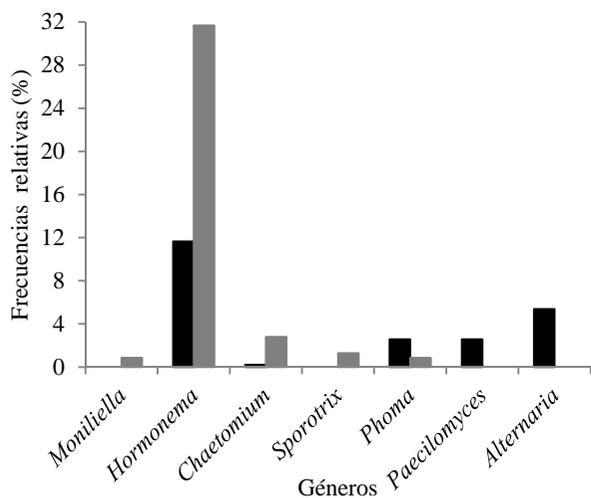
vomentenol (Pm) inhibieron por completo el crecimiento, que metil chavicol (4-alilanol) (Pp) fue el que más lo retrasó,  $\alpha$ -pineno (Pp, Pm) tuvo un efecto similar sobre ambos, que limoneno (Pm),  $\beta$ -pineno (Pm, Pp) y  $\delta$ -3-careno (Pm, Pp) efectuaron un mayor retraso sobre el crecimiento de *A. chailletii* que sobre el de *A. areolatum*, mientras el acetato de citronelilo (Pm) tuvo un efecto inverso.

**Ensayo 3. Análisis de la microbiota asociada a la madera de *Pinus ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii*.** Las cepas obtenidas a partir de la madera esterilizada de *P. menziesii* y *P. ponderosa* fueron determinados a nivel de género. Los taxones identificados fueron los siguientes: *Moniliella* Stolk et Dakin, *Hormonema*, *Chaetomium* Kunze, *Sporotrix* Hektoen et Perkins, *Phoma* Fr., *Paecilomyces* Bainier y *Alternaria* Nees. Las frecuencias relativas de los hongos endofíticos aislados en cada especie de conífera se presentan en la figura 4.

Para el género *Hormonema* la amplificación de la región ITS y la posterior búsqueda BLAST permitió identificar los aislamientos como *H. dematioides* Lagerb. et Melin (GenBank AY253451, Filip et al. 2003) con una similitud del 100 % de un total de 526 nucleótidos. Por otro lado se evaluó estadísticamente la existencia de una asociación positiva entre este hongo y alguna de las coníferas. Del análisis se desprende que la presencia de *H. dematioides* se ve afectada por la especie de conífera ( $\chi^2 = 54,927$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,05$ ). El índice de correlación de Cramer mostró una



**Figura 3.** Curvas de crecimiento de *A. areolatum* (arriba) y *A. chailletii* (abajo) en ausencia (testigo) o presencia de los compuestos analizados (\*provenientes de *Pinus ponderosa*, # provenientes de *Pseudotsuga menziesii*).  
 Growth curves (cm/day) of *A. areolatum* (up) and *A. chailletii* (down) in the absence (control) or presence of volatiles from a particular analyzed compound (\**Pinus ponderosa*, #*Pseudotsuga menziesii*).



**Figura 4.** Frecuencia relativa de los diferentes endófitos en tarugos de madera obtenidos del tercio medio de *Pinus ponderosa* (barras negras) y *Pseudotsuga menziesii* (barras grises).  
 Frequency of fungal species isolated from *Pinus ponderosa* (black) and *Pseudotsuga menziesii* (gray).

fuerza de asociación baja Cramer ( $\phi = 0,243; \leq \phi \leq$ ) pero el índice de riesgo indica que entre las especies de coníferas analizadas es tres veces más probable encontrar *H. dematioides* en *P. menziesii* que en *P. ponderosa*.

## DISCUSIÓN

Este estudio evalúa el crecimiento de las dos especies de simbiontes fúngicos asociados a los sirécidos en relación a un factor ambiental, el potencial agua y a los compuestos que conforman la defensa primaria de los hospedantes y la microbiota asociada a ellos, para entender el funcionamiento de todo el patosistema en un contexto regional. Los ensayos de  $\Psi_0$  en relación al crecimiento de *A. areolatum* aportan nuevos datos a los ya existentes para otros países, mientras que son los primeros de este tipo para *A. chailletii*. Los resultados obtenidos siguen la tendencia general de otros basidiomicetes estudiados bajo las mismas condiciones. Las tasas óptimas de crecimiento de las especies de *Amylostereum* utilizadas se producen entre los  $\Psi_0$  0 y -3,0 MPa, lo que coincide con la mayoría de hongos mesofíticos que presentan su crecimiento óptimo entre -0,6 y -3 MPa (Cook *et al.* 1972). Incluso, *A. chailletii* tiene en  $\Psi_0$  -1,5 MPa un crecimiento más rápido que el testigo. La aparente estimulación del crecimiento en los  $\Psi_0$  más bajos que los controles ha sido observada por Bleiker y Six (2009), donde los hongos asociados a *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (escarabajo de la corteza) pueden crecer mejor en medios modificados al utilizar la sacarosa disponible como fuente de carbono ya que esto compensaría algunos de los efectos adversos causados por la disminución del  $\Psi_0$  y el exceso de sales.

*Amylostereum chailletii* crece más que *A. areolatum* en los  $\Psi_0$  más bajos, lo que podría indicar que es aún más tolerante a la falta de agua y explicaría, en parte, el ataque diferencial a la madera almacenada, donde la disponibilidad de agua es más reducida. La diferencia de crecimiento de ambos hongos podría indicar un uso diferencial de los recursos disponibles en los árboles hospedantes. Si bien este ensayo demuestra que el crecimiento de *Amylostereum* spp. es afectado por el potencial agua en condiciones de laboratorio *in vitro*, Coutts y Dolezal (1965) observaron *in vivo* el mismo efecto. Recientemente, Hurley *et al.* (2012) demostraron que las interacciones de competencia entre *A. areolatum* y dos hongos manchadores de la albura frecuentemente presentes en árboles atacados por *S. noctilio* en diferentes  $\Psi_0$ , pueden estar relacionados con bajos niveles de eficacia del biocontrolador *B. siricidicola*.

De esta manera, a través de diferentes estudios, se confirma que el potencial agua tiene un efecto sobre el crecimiento de los simbiontes fúngicos de las avispas, aunque es importante señalar que, si bien podría ser uno de los factores determinantes en el establecimiento del hongo y por lo tanto de la plaga asociada, se trataría de uno más de los factores de sitio que pueden influenciar el éxito del ataque por parte de este patosistema (Coutts y Dolezal 1965). Además, el  $\Psi_0$  no sólo tiene efectos sobre *Amylostereum* spp. sino que también influyen sobre las avispas. Zondag (1959) determinó que las avispas que emergen de madera muy seca son de menor tamaño que las que emergen de madera con alto contenido de humedad, mientras que Coutts y Dolezal (1965) observaron que los huevos y larvas mueren a bajos contenidos de humedad. La tolerancia de *Amylostereum* spp. a  $\Psi_0$  bajos resulta importante por su función ecológica y sobre todo para entender su rol en el patosistema que conforma junto con las avispas y las coníferas. El impacto demostrado de este factor abiótico sobre los hongos puede ayudar a explicar la colonización de *Amylostereum* spp. en coníferas infestadas por *Sirex* spp. y *Urocerus* spp. y brindar herramientas que ayuden al manejo de la plaga.

La presencia de la fracción volátil (aceites esenciales) de las oleorresinas de las dos especies de coníferas afecta negativamente el crecimiento de ambos hongos. Los resultados del presente estudio representan la primera evidencia de este tipo de interacción para estos patosistemas. En estudios previos no se obtuvieron resultados concluyentes debido a problemas metodológicos que ocasionaron la pérdida de la fracción volátil (fue agregada durante la preparación del medio) (Kile y Turnbull 1974). El ensayo que evalúa el efecto de los componentes seleccionados como mayoritarios y diferenciales, representa el primer registro para 8 de los 10 compuestos evaluados sobre el crecimiento de *Amylostereum* spp. (excepto  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno analizados por Kile y Turnbull 1974). Además, es poco lo que se conoce sobre el crecimiento de hongos frente a los compuestos que no corresponden a la clasificación de terpenos (acetato de citronelilo y metil chavicol). Por

otra parte, es útil contar con información del efecto de los compuestos diferenciales más allá de que sean o no mayoritarios porque se ha observado que los principales componentes volátiles de las oleorresinas no siempre aumentan la resistencia de los árboles al ataque de insectos y los hongos asociados, ya que cada uno puede responder de manera diferente a distintas concentraciones de cada metabolito (Paine y Hanlon 1994).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los componentes mayoritarios de la fracción volátil de las oleorresinas de las coníferas estudiadas,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\delta$ -3-careno y limoneno, retrasan, pero no inhiben, el crecimiento de los hongos. Esto se contrapone con los resultados de Kile y Turnbull (1974) donde  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno son los compuestos volátiles más importantes en la inhibición de *A. areolatum* *in vivo*. Lu *et al.* (2010) sugieren que existen cepas de hongos simbioses del escarabajo de la corteza que pueden tener una tolerancia pre-existente a la respuesta del hospedante al poder tolerar altas concentraciones de  $\delta$ -3-careno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno, o que pueden estar adaptados para utilizarlos como fuente de carbono (Paine y Hanlon 1994).  $\Delta$ -3-careno y limoneno son terpenos que han sido relacionados con sistemas planta-insecto-patógeno y que son altamente inhibidores de hongos asociados a escarabajos (Paine y Hanlon 1994). Los compuestos diferenciales que retrasaron el crecimiento se destacan metil chavicol (compuesto diferencial de *P. ponderosa*) y acetato de citronelilo (compuesto diferencial de *P. menziesii*). El metil chavicol (4-alilanol) ha sido reportado por Eckhardt *et al.* (2009) como inhibidor del crecimiento fúngico. Con respecto al acetato de citronelilo no se obtuvo información adicional acerca de la respuesta del crecimiento de otros hongos en su presencia debido a que la mayoría de los trabajos se enfocan principalmente en los terpenos del género *Pinus* (Raffa y Berryman 1983).

Los compuestos que inhiben completamente el crecimiento de las especies de *Amylostereum* estudiadas,  $\rho$ -cimen-8-ol, diferencial de *P. ponderosa* y citronelol, hidrato de sabineno y 4-carvomentenol, diferenciales de *P. menziesii*, no se encuentran entre los componentes mayoritarios de las oleorresinas de las coníferas estudiadas. Los resultados de este ensayo, al igual que lo reportado por Kile y Turnbull (1974), indican que en las coníferas existen compuestos volátiles que son más inhibitorios que los pinenos, pero es probable que estén presentes en cantidades insuficientes en las oleorresinas constitutivas como para ser inhibidores efectivos de *Amylostereum* spp. Se sabe que las oleorresinas preformadas y las de post-ataque están constituidas por compuestos diferentes o por los mismos compuestos en diferentes proporciones (Raffa y Berryman 1983). Esto podría tener efectos diferentes en el crecimiento de *Amylostereum* spp. ya que se ha observado, en coníferas atacadas por el escarabajo de la corteza, que las oleorresinas producidas producto del ataque de la plaga son las que proporcionan el principal factor en la resistencia (Raffa y Berryman 1983). La importancia

de la fracción volátil también reside en su efecto sobre la consistencia de las oleorresinas. Así, las oleorresinas ricas en terpenos volátiles son más fluidas, y esto permite que fluyan más fácilmente en las cavidades de oviposición y en las galerías teniendo, por lo tanto, un impacto letal más directo en los huevos y larvas que la oleorresina más viscosa (Brigden *et al.* 1979).

La micobiota asociada con la albura de *P. ponderosa* y *P. menziesii* aislada en este ensayo se compone de siete géneros: *Moniliella*, *Sporotrix* (sólo presentes en *P. menziesii*), *Paecilomyces*, *Alternaria* (sólo presentes en *P. ponderosa*), *Hormonema*, *Chaetomium* y *Phoma* (presentes en ambas especies). Todos estos organismos han sido previamente reportados como endófitos de árboles forestales (Hoff *et al.* 2004, Goetz 2006). El que predominó entre los hongos aislados en la albura de *P. ponderosa* y *P. menziesii* fue *H. dematioides*, resultado que es similar al observado por Goetz (2006) para la micobiota asociada a raíces de las mismas especies de coníferas. Es importante destacar que la frecuencia de aparición de *H. dematioides* en *P. menziesii* fue 3,4 veces mayor que en *P. ponderosa*, lo que sugiere una asociación más fuerte entre esta conífera y el endófito mayoritario. *Hormonema* es un género que se ha aislado de acículas y semillas de diferentes especies de *Pinus* y de raíces de *P. ponderosa* y *P. menziesii* (Hoff *et al.* 2004, Goetz 2006, Ganley *et al.* 2008). Las especies de *Hormonema* pueden producir compuestos antifúngicos por lo que podrían considerarse como potenciales controladoras biológicas (Peláez *et al.* 2000). Los endófitos pueden aumentar la protección del hospedante a hongos patógenos mediante la producción de metabolitos antagónicos (Arnold *et al.* 2003, Goetz 2006), estando involucrados en la defensa de *P. monticola* Douglas ex Lamb al reducir los daños producidos por patógenos, y en la disminución de necrosis foliar y la mortalidad de cacao frente a un patógeno importante como es *Phytophthora* spp. de Bary (Arnold *et al.* 2003, Ganley *et al.* 2008). Los resultados obtenidos brindan la perspectiva para la realización de próximos análisis de interacción entre *H. dematioides* y *A. areolatum*.

Aquí se examina la influencia que pueden tener sobre *Amylostereum* spp. de sólo tres: el  $\Psi_0$ , la defensa primaria de los hospedantes en base a la fracción volátil de las oleorresinas y la micobiota asociada a ellos, pero otras variables pueden influenciar el comportamiento del hongo simbiote y, por lo tanto, el funcionamiento de todo el patosistema. Los resultados permiten concluir que dentro de los estudios de las plagas invasoras se deberían también considerar las relaciones mutualistas y antagonistas entre especies exóticas y sus simbioses.

## CONCLUSIONES

El potencial agua y las oleorresinas son variables importantes para el desarrollo de *Amylostereum* spp., y por transferencia, también son relevantes en el establecimiento y éxito de infestación por parte de los otros miembros del

patosistema, los géneros *Sirex* y *Uroceurs*. Ambos hongos se ven afectados de la misma manera por la fracción volátil de las oleorresinas de diferentes especies de coníferas indicando que el hongo no tendría un papel preponderante en la elección del hospedante y que los estudios deberían enfocarse también en el efecto de las resinas sobre los sirícidos directamente. Por otro lado, en este estudio se analizó la oleorresina constitutiva, sería importante además efectuar una evaluación de la composición de la misma en árboles atacados y, si bien estudios en madera bajo condiciones naturales son difíciles de efectuar, este tipo de información sería muy útil para el establecimiento de estrategias de manejo del patosistema conformado por los sirícidos y sus hongos simbioses.

Tanto *P. ponderosa* como *P. menziesii* presentaron diversidad de microbiota asociada a la albura. La diferencia de frecuencia de aparición de *H. dematioides* con crecimiento endofítico, entre ambas coníferas, presenta una variable a considerar en cuanto al establecimiento del complejo *S. noctilio* - *A. areolatum* en *P. menziesii*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la estación experimental INTA Trevelin, a la Municipalidad de la ciudad de Esquel y al señor Carlos Baroli por facilitarnos los sustratos para los ensayos.

## REFERENCIAS

- Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, DJ Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Arnold AE, LC Mejía, D Kylo, E Rojas, Z Maynard, NA Robbins, EA Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15649-15654.
- Bandoni A. 2000. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 410 p.
- Bleiker K, DL Six. 2009. Effects of water potential and solute on growth and interactions of two fungal symbionts of the mountain pine beetle. *Mycological Research* 113: 3-15.
- Boddy L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 185-194.
- Brigden MR, JW Hanover, JR Wilkinson. 1979. Oleoresin characteristics of eastern white pine seed sources and relationship to weevil resistance. *Forest Science* 25: 175-183.
- Carmichael JW, WB Kendrick, IL Connors, L Sigler. 1980. Genera of hyphomycetes. Alberta, Canadá. The University of Alberta Press. 388 p.
- Cook RJ, RI Papendick, DM Griffin. 1972. Growth of two root-rot fungi as affected by osmotic and matrix water potentials. *Soil Science Society of America Proceedings* 36: 78-82.
- Council of Europe. 1997. Methods of Pharmacognosy. In European Pharmacopoeia, 3rd Ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. p. 121-122.
- Coutts MP, JE Dolezal. 1965. *Sirex noctilio*, its associated fungus, and some aspects of wood moisture content. *Australian Forestry Research* 1(4): 3-13.
- Eckhardt LG, RD Menard, ED Gray. 2009. Effects of oleoresins and monoterpenes on in vitro growth of fungi associated with pine decline in the Southern United States. *Forest Pathology* 39: 157-167.
- Filip P, RWS Weber, O Sterner, T Anke. 2003. Hormonemate, a new cytotoxic and apoptosis-inducing compound from the endophytic fungus *Hormonema dematioides*. *Zeitschrift für Naturforsch* 58 (7-8): 547-552.
- Ganley RJ, RA Sniezko, G Newcombe. 2008. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management* 225: 2751-2760.
- Goetz JR. 2006. Fungal endophytes isolated from large roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). M.S. Thesis. Pullman, WA. Washington State University. 116 p.
- Haugen DA, RA Bedding, MG Underdown, FG Neumann. 1990. National strategy for control of *Sirex noctilio* in Australia. *Australian Forest Grower* 13(2): Special liftout section N° 13. 8 p.
- Hodges JD, WW Elam, WR Watson, TE Nebeker. 1979. Oleoresin characteristics and susceptibility of four southern pines to southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) attacks. *Canadian Entomologist* 111: 889-896.
- Hoff JA, NB Klopfenstein, GI McDonald, JR Tonn, MS Kim, PJ Zambino, PF Hessburg, JD Rogers, TL Peever, LM Carris. 2004. Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* 34: 255-271.
- Hurley BP, HJ Hatting, MJ Wingfield, KD Klepzig, B Slippers. 2012. The influence of *Amylostereum areolatum* diversity and competitive interactions on the fitness of the *Sirex* parasitic nematode *Deladenus siricidicola*. *Biological Control* 61: 207-214.
- Kile GA, CRA Turnbull. 1974. The effect of radiata pine resin and resin components on the growth of the *Sirex* symbiont *Amylostereum areolatum*. *Australian Forestry Research* 6(4): 27-34.
- Lu M, MJ Wingfield, NE Gillette, SR Mori, JH Sun. 2010. Complex interactions among host pines and fungi vectored by an invasive bark beetle. *New Phytologist* 187: 859-866.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, AR). 2012. Elaboración de un mapa de plantaciones forestales de la República Argentina de actualización permanente. Área SIG e Inventario Forestal. Dir. de Producción Forestal. Ministerio de Agric. Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Consultado 19 jul. 2012. Disponible en <http://www.minagri.gob.ar/new/00/forestacion/inventario/mapa%20de%20planta.html>
- Paine TD, CC Hanlon. 1994. Influence of oleoresin constituents from *Pinus ponderosa* and *Pinus jeffreyi* on the growth of the mycangial fungi from *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus brevicomis*. *Journal of Chemical Ecology* 20: 2551-63.
- Peláez F, A Cabello, G Platas, M Díez, A González del Val, A Basilio, I Martan, F Vicente, G Bills, R Giacobbe, R Schwartz, J Onishi, M Meinz, G Abruzzo, A Flattery, L

- Kong, M Kurtz. 2000. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species. Biological activity and taxonomy of the producing organism. *Systematic and Applied Microbiology* 23: 333-343.
- Pildain MB, M Rajchenberg. 2011. Variación genética y posible origen del hongo asociado a la avispa de los pinos, *Amylostereum areolatum*, en Patagonia, Argentina. Libro de actas VII Congreso Latinoamericano de Micología. Asociación latinoamericana de micología. San José, Costa Rica.
- Raffa KF, AA Berryman. 1983. Physiological aspects of lodgepole pine wound responses to a fungal symbiont of the mountain pine beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Canadian Entomologist* 115: 723-734.
- Retta D, M Gattuso, S Gattuso, P Di Leo Lira, C van Baren, A Bandoni. 2009. Volatile constituents of five *Baccharis* species from the Northeastern Argentina. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (7): 1379-1384.
- Slippers B, P de Groot, MJ Wingfield eds. 2012. The *Sirex* Woodwasp and its Fungal Symbiont: Research and Management of a Worldwide Invasive Pest. Springer Science+Business Media B.V. 301 p. DOI 10.1007/978-94-007-1960-6\_5.
- Talbot PHB. 1977. The *Sirex-Amylostereum-Pinus* association. *Annual Review of Phytopathology* 15: 41-54.
- Wang CJK, RA Zabel (eds.). 1990. Identification manual for fungi from utility poles in the eastern United States. Rockville, USA. American Type Culture Collection. 352 p.
- Whiting EC, DM Rizzo. 1999. Effect of water potential on radial colony growth of *Armillaria mellea* and *A. gallica* isolates in culture. *Mycologia* 91: 627-635.
- Zondag R. 1959. Progress report on the establishment in New Zealand of *Ibalia leucospoides* (Hochenw.), a parasite of *Sirex noctilio*. *New Zealand Forestry Research Notes* 20: 1-16.

Recibido: 20.07.12  
Aceptado: 26.03.13

