

Eventos tempranos en el proceso de infección de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en raíces de plántulas de *Pinus radiata* D. Don y sus efectos en la eficiencia fotosintética como indicador de estrés biótico

Early events in the infection process of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in *Pinus radiata* D. Don seedlings and its effects on photosynthetic efficiency as biotic stress indicator

ADRIÁN GARRIDO BIGOTES^{1*}, GIANNINA ISABELLA ESPINOZA GALINDO¹, PATRICIA SÁEZ DELGADO², MARÍA JESÚS CAÑAL VILLANUEVA³, EUGENIO SANFUENTE VON STOWASER⁴ & RODRIGO HASBÚN ZAROR¹

¹Laboratorio de Epigenética Vegetal, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. Victoria 631, Barrio Universitario, Casilla 160-C, Correo 3, Concepción, Chile.

²Laboratorio de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Victoria 631, Barrio Universitario, Casilla 160-C, Correo 3, Concepción, Chile.

³Área de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Asturias, España.

⁴Laboratorio de Patología Forestal, Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Casilla 160-C, Correo 3, Concepción, Chile.

*adrigarrido@udec.cl

RESUMEN

Los eventos tempranos que ocurren luego de inocular raíces de plántulas de *Pinus radiata* con el hongo patógeno *Macrophomina phaseolina* son desconocidos. Los objetivos de este estudio fueron conocer el proceso de germinación de los microesclerocios y la penetración de las hifas de *M. phaseolina* en raíces de plántulas de *P. radiata*, y establecer posibles efectos en la eficiencia fotosintética durante las primeras horas de la infección del patógeno. Para ello se inocularon raíces de plántulas de 25 días de edad con microesclerocios de *M. phaseolina* bajo condiciones *in vitro*. Las primeras horas del ciclo de enfermedad, seguido a la inoculación de las raíces, fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido y la eficiencia del fotosistema II mediante la fluorescencia de la clorofila *a*. La penetración del patógeno al interior de la raíz ocurrió 48 h post-inoculación (hpi), y la colonización de la superficie de la raíz se hizo evidente por la presencia de numerosas hifas una vez transcurridas 72 hpi. Los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a* evidenciaron variaciones una vez ocurrida la colonización y la penetración de las raíces de las plántulas, con una disminución de los valores F_v/F_m a partir de 120 hpi. La infección de la raíz de *P. radiata* causada por *M. phaseolina* provocó un estrés en la planta, evidenciado por una variación de los parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*.

PALABRAS CLAVE: Pudrición carbonosa, enfermedades de viveros, patógenos forestales, germinación de microesclerocios, eficiencia máxima del FSII.

ABSTRACT

Early events occurring after inoculation of *Pinus radiata* seedlings with *Macrophomina phaseolina*, fungal pathogen causing charcoal root rot, are unknown. The objectives of this study were to determine the germination process of microsclerotia and penetration of hyphae of *M. phaseolina* into roots of *P. radiata* seedlings and to establish probably effects on photosynthetic efficiency during early hours of infection pathogen. For this, 25-day-old seedling roots were inoculated with *M. phaseolina* microsclerotia under *in vitro* conditions. First hours of disease cycle after root inoculation were studied by scanning electron microscopy and efficiency of photosystem II by measuring the fluorescence of chlorophyll *a*, after inoculating of *P. radiata* seedling roots with *M. phaseolina* microsclerotia. The penetration of the pathogen into the root occurred 48 h post inoculation (hpi), and surface colonization was evident by the presence of numerous hyphae after 72 hpi. The parameters of chlorophyll *a* fluorescence showed variations at once occurred colonization and penetration of seedling roots, with a decrease of F_v/F_m values from 120 hpi. Infection root of *P. radiata* with *M. phaseolina* microsclerotia generated a stress in the plant which resulted in variations in fluorescence parameters of chlorophyll *a*.

KEYWORDS: Charcoal rot, nursery diseases, forest pathogens, microsclerotial germination, PSII maximum efficiency.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son afectadas negativamente por factores de estrés de origen biótico y abiótico que determinan su éxito en el ambiente donde crecen. Gran cantidad de microorganismos se comportan como patógenos, y el resultado de las interacciones compatibles planta-microorganismo patógeno determinan la ocurrencia de enfermedades (Glazebrook 2005).

Las interacciones planta-patógeno conducen a cambios a nivel de metabolismo primario y secundario que afectan al crecimiento y desarrollo de la planta (Berger *et al.* 2007, Mazid *et al.* 2011). En cuanto al metabolismo primario, el ataque de patógenos resulta en una disminución de la tasa fotosintética (Kocal *et al.* 2008, Luque *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2006, Alonso *et al.* 2011), la que puede estimarse mediante la fluorescencia de la clorofila *a* y los parámetros a través de los cuales se mide (F_0 y F_v/F_m) (Maxwell & Johnson 2000).

Los patógenos necrótrofos de las raíces poseen un bajo nivel especificidad de hospederos, a diferencia de lo que ocurre en los patógenos biótrofos de hojas y raíces. Entre los hongos patógenos más comunes de raíces se encuentran, especies de *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora* (Okubara & Paulitz 2005). Varios de estos hongos penetran a través de la rizodermis (Okubara & Paulitz 2005), no obstante, al producirse la interacción patógeno-hospedero a diferentes profundidades en el suelo, se vuelve difícil estudiar los procesos de infección y posterior colonización (Bais *et al.* 2006).

Un importante patógeno de raíces es *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., hongo necrótrofo que causa la enfermedad denominada “pudrición carbonosa de la raíz” en más de 500 especies de plantas, especialmente en cultivos agrícolas, donde la interacción ha sido más estudiada (Kaur *et al.* 2012). También causa enfermedad en otras plantas herbáceas y leñosas (Songa & Hillocks 1996, McCain & Scharpf 1989), siendo entre estas últimas *Pinus radiata* D. Don una de las coníferas más afectada (Muñoz 2006). Este patógeno tiene distribución mundial y su incidencia y prevalencia es mayor en regiones tropicales y subtropicales con climas áridos y semiáridos (Kaur *et al.* 2012). En Chile, la pudrición carbonosa fue reportada por primera vez en soya por Nome & Ocampo (1968) y en poroto por Latorre & Caffati (1973) citados por Mújica & Vergara (1980). Posteriormente, fue detectada en viveros forestales de *P. radiata* en el año 1983 (Butin & Peredo 1986), y ha seguido siendo reportada en especies de latifoliadas y coníferas nativas, demostrando altos niveles de susceptibilidad al patógeno, especialmente durante el periodo de viverización (Hinojosa 1997).

El patógeno persiste en el suelo en forma de microesclerocios durante largos periodos de tiempo, hasta aproximadamente 15 años (Short *et al.* 1980). Los

microesclerocios germinan al entrar en contacto con las raíces secundarias, continuando el crecimiento de las hifas en la superficie de las raíces hasta que penetra la rizodermis. El patógeno prosigue colonizando hasta alcanzar la raíz principal, causando la detención del crecimiento, manifestado en clorosis y marchitamiento foliar, finalizando con la muerte de la planta. En los últimos estadios de la enfermedad se forman los microesclerocios, estructuras de resistencia de color negro en la corteza interior de las raíces y en la parte inferior del tallo. Cuando la planta muerta se descompone, los microesclerocios son liberados, y funcionan como inóculo en las nuevas plántulas (Smith *et al.* 1969). La enfermedad está influenciada por factores abióticos, como la disponibilidad de agua (estrés hídrico en la planta) y temperaturas elevadas (30-40 °C) (Meyer & Sinclair 1974), así como también por componentes bióticos como los exudados radiculares que determinan el inicio y severidad de la enfermedad (Smith 1969).

Los síntomas en las raíces son ennegrecimiento de la raíz principal y las raíces laterales. En la parte aérea ocurre detención del crecimiento, clorosis y marchitamiento, sin embargo la mayoría de estos síntomas no se manifiestan en los primeros estadios de la infección (Smith *et al.* 1989). Las primeras observaciones del proceso de infección de *M. phaseolina* fueron realizadas en raíces de *Glycine max* (L.) Merr., determinando el tiempo de germinación de los microesclerocios, el patrón de crecimiento de las hifas, la formación de apresorios y los efectos celulares de la penetración del patógeno (Ammon *et al.* 1974, 1975). Un estudio reciente caracterizó *in-vitro* la penetración e infección del hongo sobre las raíces en la interacción de *M. phaseolina* con diferentes variedades susceptibles y resistentes de *Sesamum indicum* L. (Chowdhury *et al.* 2014).

Los objetivos de este estudio fueron conocer el proceso de germinación de los microesclerocios y la penetración de las hifas de *M. phaseolina* en raíces de plántulas de *P. radiata*, y establecer posibles efectos en la eficiencia fotosintética durante las primeras etapas de la infección del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

En el estudio fueron utilizadas plántulas de *P. radiata* originadas por semillas. Las semillas de *P. radiata* fueron desinfectadas superficialmente con peróxido de hidrógeno al 30%, durante 15 min y lavadas tres veces con agua destilada estéril (ADE) durante 10 min. Posteriormente, las semillas fueron embebidas en ADE durante 24 h y después 24 h en una solución de giberelina (GA_3) a una concentración de 300 mg/L. Las semillas se depositaron en placas de Petri conteniendo agar-agua al 1%, y luego incubadas a 20°C, durante 10 días, en oscuridad, hasta el inicio de la

germinación. Las semillas germinadas fueron transferidas a cámara de crecimiento a 25 °C, con fotoperiodo de 16 h, durante 25 días.

PATÓGENO Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO

Fue utilizada la cepa de *M. phaseolina* Mph9 proporcionada por el Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. La cepa fue obtenida desde el suelo del vivero Proplanta, Quinchamalí, Chile (36° 38' 53,77" S - 72° 24' 9,81" O), que posee registro de ataques previos de *M. phaseolina* en *P. radiata*. El patógeno se cultivó en medio agar-patata-dextrosa (APD), a una temperatura de 25 °C, durante días. Desde las colonias formadas se obtuvieron discos de micelio con microesclerocios, que fueron dispuestos en matraces de 250 ml con caldo-patata-dextrosa (PDB), seguido de incubación durante 21 días a 31 °C, en oscuridad. Posteriormente, los microesclerocios y el micelio fueron colectados, secados a 30 °C, y tamizados con un diámetro de malla de 45-200 µm.

INOCULACIÓN Y PRUEBAS DE VIABILIDAD

Raíces de plántulas de *P. radiata* con 25 días de edad se sumergieron en una solución de carboximetilcelulosa 1%, y se transfirieron a una placa de Petri con papel filtro húmedo estéril. Las raíces se inocularon desde las puntas a lo largo de 1 cm, depositando 10 microesclerocios sobre cada raíz. Las raíces control fueron únicamente sumergidas en la solución de carboximetilcelulosa 1%. La zona de las raíces inoculada se cubrió con papel de aluminio, se mantuvieron a 25 °C y se recolectaron las raíces inoculadas y control a las 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h post-inoculación (hpi).

La germinación de microesclerocios de *M. phaseolina* fue evaluada a los distintos tiempos post-inoculación mediante lupa estereoscópica (X40), en dos réplicas por cada tiempo, consistente en 20 microesclerocios cada una. Paralelamente, se efectuaron ensayos de germinación en medio de cultivo APD, depositando microesclerocios individuales del patógeno sobre la superficie del medio de cultivo, en tres réplicas por cada tiempo, seguido de incubación a 25 °C, en oscuridad, evaluándose a los mismos tiempos que el ensayo en raíces. La germinación de los microesclerocios fue observada con lupa estereoscópica (X40), y la viabilidad se determinó evaluando la germinación de 30 microesclerocios.

La observación del crecimiento del micelio de *M. phaseolina* sobre la raíz de las plantas y luego la penetración fue realizada mediante microscopía de barrido. Para tal efecto, las raíces colectadas en los diferentes tiempos post-inoculación se fijaron en glutaraldehído 2,5 %. Luego, se lavaron en buffer fosfato, deshidrataron con alcohol, y fueron sometidas a secado a punto crítico. Finalmente, las muestras fueron observadas con microscopio electrónico de barrido JSM-6380.

MEDIDA DE LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

La fluorescencia de la clorofila *a* se midió con Handy PEA (Hansatech, UK) en las acículas de plántulas control y en las inoculadas, a las 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi. El parámetro empleado para evaluar la eficiencia del FSII fue $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$ (Rosenquist & Van Kooten 2006). En primer lugar se determinó la fluorescencia inicial (F_0) por exposición de la zona media de seis acículas de la plántula a 6 µmol/m² s. Posteriormente, se aplicó un pulso de luz saturante de 9000 µmol/m² s durante 0,8 s para determinar el máximo de emisión de fluorescencia (F_m). Se realizaron tres réplicas biológicas por cada hpi.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico de los resultados de fluorescencia de la clorofila *a* fue realizado con un ANOVA de dos vías. Se realizó el test LSD de Fisher para detectar diferencias entre los tratamientos y tiempos post-inoculación, así como el efecto de la interacción tratamiento-tiempo. El análisis se llevó a cabo mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2013).

RESULTADOS

GERMINACIÓN DE MICROESCLEROCIOS Y CRECIMIENTO DEL PATÓGENO

En la superficie de las raíces de *P. radiata* la germinación de microesclerocios de *M. phaseolina* fue 36 y 83%, a las 24 y 48 hpi, respectivamente, en cambio en el medio de cultivo APD la germinación fue de 83% a las 24 h, 93% a las 48 h.

Las plántulas inoculadas con los microesclerocios del patógeno no evidenciaron ningún tipo de sintomatología hasta 144 hpi, al igual que las plantas control. A partir de 12 hpi comenzó la germinación de los microesclerocios (Fig. 1A y 1B), evidenciado por la formación de tubos germinativos, continuando el crecimiento de las hifas, alcanzando una longitud entre 60-80 µm (Fig. 1B). Transcurridas 24 hpi aumentó el número de microesclerocios germinados, junto con una mayor longitud de las hifas (Fig. 1C). A las 48 hpi continuó la germinación, con la formación de más tubos germinativos por microesclerocio, y las hifas continuaron extendiéndose en la superficie de la raíz (Fig. 1D). En este tiempo, se observó la adhesión de la hifa a la superficie de la raíz y la formación de estructuras semejantes a un apresorio, indicando el inicio de la penetración del patógeno (Fig. 1E y 1F). A las 72 hpi se constató el mayor número de microesclerocios germinados y una mayor colonización de la superficie radicular (Fig. 2A), además de la formación de numerosos apresorios (Fig. 2B, 2C y 2D). El micelio formado en la superficie de la raíz no presentó un patrón de crecimiento reconocible (Fig. 2A), aunque se observó agrupamiento de algunas hifas sobre la superficie de la rizodermis (Fig. 2C). Hasta la última evaluación, las raíces en el control no presentaban crecimiento de hifas de ningún tipo de hongo (Fig. 2E y 2F).

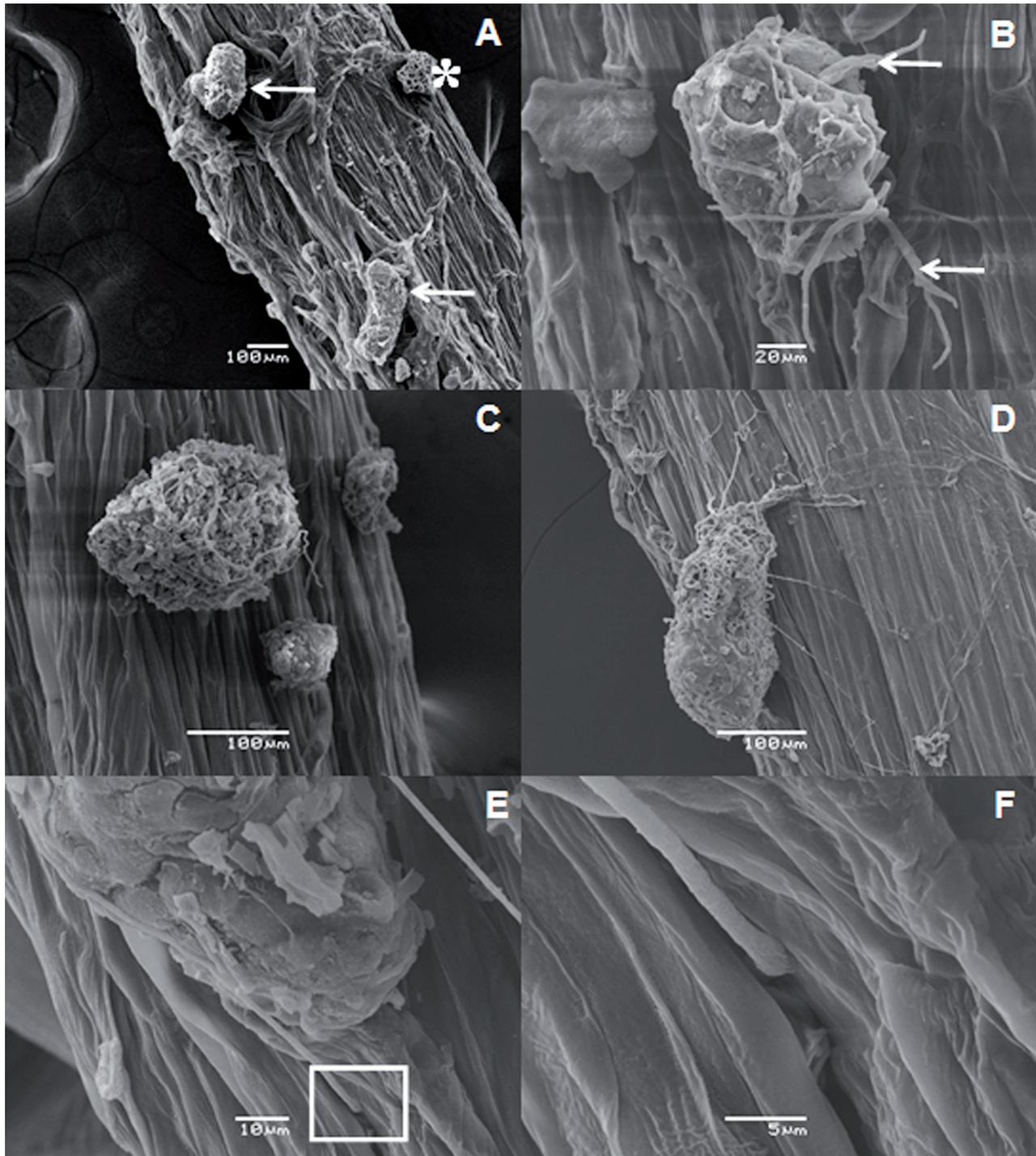


FIGURA 1. Germinación y crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* en la superficie de las raíces de *Pinus radiata*. A) ausencia de germinación (flechas) a 6 hpi y tejido pseudoparenquimático de un microesclerocio (*). B) tubos germinativos desde microesclerocios (flechas) a 12 hpi. C) a 24 hpi. D) a 48 hpi. E) y adhesión de la hifa (recuadro blanco) a 48 hpi. F) Detalle de adhesión de la hifa a 48 hpi.

FIGURE 1. Germination and mycelial growth of *Macrophomina phaseolina* on root surface of *Pinus radiata*. A) absence of germination (arrows) at 6 hpi and pseudoparenchymatous tissue of a microsclerotium (*). B) germ tubes from microsclerotia (arrows) at 12 hpi. C) at 24 hpi. D) at 48 hpi. E) adhesion of hyphae (white box) at 48 hpi. F) Detail of hyphae adhesion at 48 hpi.

FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*

En las plántulas de *P. radiata* no inoculadas, los valores de F_v/F_m fluctuaron entre 0,787 y 0,806, no existiendo diferencias significativas durante el periodo de estudio. Las plántulas inoculadas presentaron valores de F_v/F_m entre 0,726 y 0,815,

disminuyendo el valor de esta relación transcurridas las 96 hpi, siendo este efecto más consistente a partir de las 120 hpi. Entretanto, el valor F_0 tuvo un comportamiento análogo a F_v/F_m en las plántulas inoculadas y no inoculadas (Tabla I).

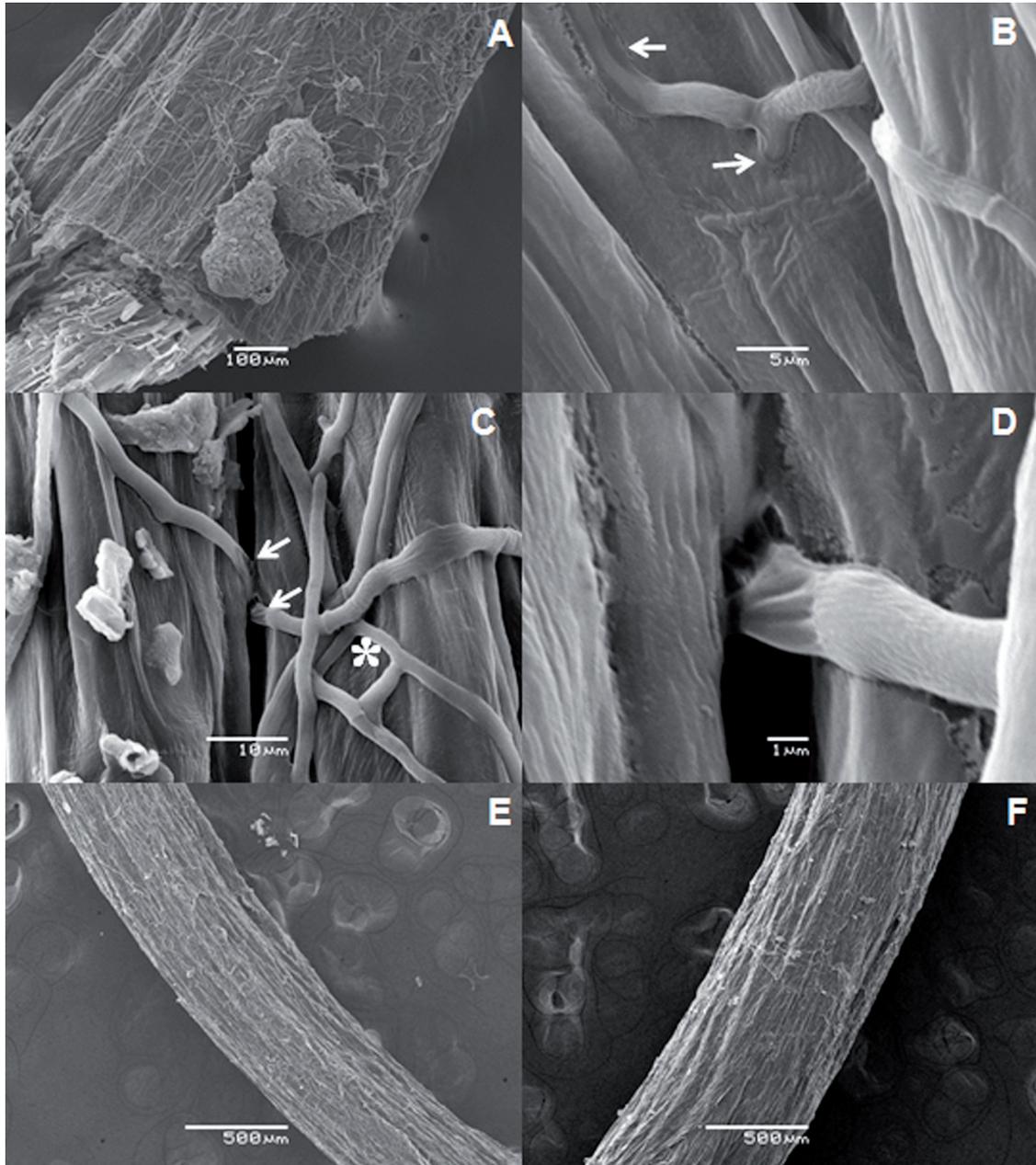


FIGURA 2. Crecimiento de *Macrophomia phaseolina* a 72 h post-inoculación (hpi). A) Colonización superficial por las hifas. B) Puntos de penetración (flechas). C) Penetración por aperturas naturales de la raíz (flechas) y agrupación de hifas (*). D) Formación del apresorio y penetración. E y F) Raíces de plántulas control.

FIGURE 2. Growth of the pathogen at 72 h post-inoculation (hpi). A) Surface colonization by hyphae. B) Points of penetration (arrows). C) Penetration of natural openings of the root (arrows) and grouping of hyphae (*). D) Appressorium formation and penetration. E and F) Roots of control seedlings.

TABLA I. Valores medios de los parámetros de fluorescencia (F_0 y F_v/F_m) de la clorofila *a* obtenidos para plántulas de *Pinus radiata* control e inoculadas con *Macrophomina phaseolina* en los diferentes tiempos post-inoculación. Letras diferentes indican diferencias significativas para los parámetros F_0 y F_v/F_m (p-valor $\leq 0,05$).

TABLE I. Mean values of fluorescence parameters (F_0 and F_v/F_m) of chlorophyll *a* obtained for control and inoculated seedlings *Pinus radiata* with *Macrophomina phaseolina* at different times after inoculation. Different letters show significative differences for F_0 and F_v/F_m parameters (p-value ≤ 0.05).

TIEMPO (hpi)	CONTROLES		INOCULADAS	
	F_0	F_v/F_m	F_0	F_v/F_m
0	519,7 ± 45,0 ^{abc}	0,793 ± 0,002 ^{bc}	547,7 ± 39,9 ^{abc}	0,799 ± 0,005 ^{bc}
12	534,7 ± 98,3 ^{abc}	0,793 ± 0,001 ^{bc}	485,3 ± 123,9 ^a	0,798 ± 0,006 ^{bc}
24	459,3 ± 41,6 ^a	0,797 ± 0,005 ^{bc}	499,7 ± 24,2 ^{ab}	0,809 ± 0,005 ^{bc}
48	581,7 ± 30,4 ^{abcd}	0,806 ± 0,002 ^{bc}	620,0 ± 80,3 ^{abcd}	0,804 ± 0,012 ^{bc}
72	602,0 ± 0,0 ^{abcd}	0,805 ± 0,002 ^{bc}	545,0 ± 33,8 ^{abc}	0,815 ± 0,010 ^c
96	469,7 ± 53,7 ^a	0,806 ± 0,004 ^{bc}	747,0 ± 33,8 ^d	0,785 ± 0,018 ^b
120	592,0 ± 86,7 ^{abcd}	0,805 ± 0,008 ^{bc}	664,3 ± 9,8 ^{bcd}	0,733 ± 0,005 ^a
144	481,7 ± 80,8 ^a	0,787 ± 0,008 ^b	688,7 ± 43,9 ^{cd}	0,726 ± 0,012 ^a

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación muestran el proceso temprano de infección de *M. phaseolina* sobre raíces de *Pinus radiata*, y el efecto del patógeno sobre la eficiencia fotosintética, considerándose esta variable como un indicador de estrés biótico previo a la aparición de síntomas.

La germinación de los microesclerocios de *M. phaseolina* en el medio de cultivo fue de 93% a las 48 hpi, similar a los valores obtenidos por Smith (1969) con 90% de germinación a las 48 hpi, y por Aynaru & Green (1973) con 72% de germinación de microesclerocios a 15 h en medio APD. Los niveles de germinación obtenidos no serían comparables a lo que ocurriría en condiciones de campo, donde numerosos factores estarían influenciando la germinación de los microesclerocios, como es el crecimiento de la raíz a través del suelo, y el efecto de la interacción con otros microorganismos de la rizosfera (Raaijmakers *et al.* 2009).

En la superficie de las raíces de *P. radiata* la germinación de los primeros microesclerocios de *M. phaseolina* se observó transcurridas las 12 hpi, y continuó aumentando en las siguientes 12 h. La germinación de los microesclerocios en *P. radiata* fue más rápida comparado a lo observado en otras especies. Smith (1969) constató que la germinación de los microesclerocios de *M. phaseolina* era estimulada por exudados de las raíces de plántulas de 18 días de edad de *Pinus lambertiana* Douglas, considerando estos exudados fundamentales en el desarrollo de la enfermedad. Ammon *et al.* (1975) observaron la germinación de los microesclerocios desde los 3 días post-inoculación

(dpi) sobre raíces de *Glicine max*. La germinación de los microesclerocios detectada por Chowdhury *et al.* (2014) comenzó una vez transcurridas 24 h sobre raíces de *Sesamum indicum*. Estas diferencias en los tiempos de germinación de los microesclerocios del patógeno podrían asociarse a las condiciones del ensayo, así como a la especie del hospedero. El crecimiento de las hifas sobre la raíz de *P. radiata* comenzó a partir de 48 hpi, sin presentar un patrón de crecimiento reconocible, observándose la formación de apresorios, estructuras fúngicas especializadas en la infección para obtener nutrientes de la planta (Deising *et al.* 2000) que generan altas presiones mecánicas para facilitar la penetración (Howard *et al.* 1991). La formación de apresorios por el patógeno ya fue relatada por Ammon *et al.* (1975) y Chowdhury *et al.* (2014), observados como un hinchamiento de las puntas de las hifas sobre la superficie de las raíces de *G. max* y *S. indicum*. A las 72 hpi, continuó la colonización del patógeno sobre la superficie de la raíz, detectándose numerosas estructuras semejantes a apresorios. Se observaron diversos puntos de penetración de las hifas a través de grietas o heridas en depresiones de la rizodermis. En forma semejante, Ammon *et al.* (1975) describió numerosos puntos de formación de apresorios y de penetración en depresiones y crestas epidérmicas. No se constató la formación de microesclerocios sobre las raíces durante el tiempo de evaluación, coincidiendo con un reporte anterior (Chowdhury *et al.* 2014), aunque se observaron agrupamientos de hifas sobre la superficie de la raíz a 72 hpi, lo que podría corresponder a la fase previa antes de ocurrir la diferenciación de los microesclerocios (Dhingra & Sinclair 1978).

Durante el periodo de evaluación del ensayo (144 hpi), las plántulas de *P. radiata* no presentaron síntomas radiculares o foliares visibles. Las causas probables serían la baja cantidad de inóculo (número de microesclerocios), ausencia de estrés hídrico y de temperaturas elevadas (40°C) (Meyer & Sinclair 1974), y el tiempo de evaluación para la expresión de los síntomas en las raíces y acículas.

La variación en los parámetros de fluorescencia, F_0 y F_v/F_m , comúnmente son empleados para evaluar fotoinhibición (Valladares & Percy 1997), y son considerados indicadores de estrés en las plantas. Después de la inoculación de las raíces de *P. radiata* con *M. phaseolina*, los valores de F_0 muestran una tendencia al incremento y una tendencia a la disminución en el caso de F_v/F_m a partir de 96 hpi. Tanto en las plántulas control e inoculadas, los valores promedio de F_v/F_m estuvieron desde el inicio por debajo del valor normal 0,83 (Murchie & Lawson 2013), lo cual estaría indicando estrés basal, probablemente relacionado con las condiciones de crecimiento *in vitro* (Materán *et al.* 2015, Matysiak & Gabryszewska 2016).

El análisis estadístico de los valores F_0 de las plántulas inoculadas y no inoculadas indicó diferencias significativas durante los tiempos ensayados. Se ha comprobado que el parámetro F_0 es más alto en plantas inoculadas con patógenos (Maxwell & Johnson 2000, Alonso *et al.* 2011), tendencia que muestran los valores obtenidos en este estudio para los últimos tiempos post-inoculación. En el caso del parámetro F_v/F_m se constató una disminución de la eficiencia del FSII y fotoinhibición de la fotosíntesis, reflejadas en una disminución de este parámetro a partir de las 120 hpi. El efecto negativo sobre la fotosíntesis es semejante a lo verificado como consecuencia de infecciones causadas por patógenos foliares como *Puccinia psidii* G. Winter (Alonso *et al.* 2011, Sebela *et al.* 2012) y de raíz, como *Phytophthora cinnamomi* Rands (Luque *et al.* 1999) y *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Wagner *et al.* 2006).

Murchie & Lawson (2013) postularon que debido a que el valor F_v/F_m evalúa únicamente la eficiencia del FSII, el estrés que es provocado en cualquier otra parte de la planta como pueden ser las raíces, no se manifestaría como un cambio en el valor de F_v/F_m . En contraste, los resultados obtenidos mediante la inoculación de *M. phaseolina* en raíces de plántulas de *P. radiata* indican una alteración de los parámetros normales de fluorescencia (F_v/F_m), a partir de las 120 hpi, asociado al estrés provocado por la infección por el patógeno. La explicación a este comportamiento podría atribuirse a los efectos del patógeno en los tejidos internos de la raíz. Las hifas del patógeno, después de penetrar la rizodermis, avanzan por los espacios intercelulares, para finalmente invadir las células xilemáticas del haz vascular (Ammon *et al.* 1974), obstruyendo este tejido en las angiospermas (Chowdhury *et al.* 2014), mientras que en las gimnospermas invadiría las traqueidas, restringiendo el transporte de agua desde las raíces hacia las acículas y, por

tanto, generando un estrés hídrico que estaría provocando los cambios a nivel del aparato fotosintético. Este efecto provocado por el patógeno se haría más patente a medida que transcurre el tiempo de interacción entre el patógeno y la raíz.

Los resultados del estudio verificaron que las fases iniciales de la infección de *M. phaseolina* están marcadas por la germinación de microesclerocios durante el transcurso del ensayo, la colonización superficial de las hifas sobre las raíces y la formación de estructuras semejantes a los apresorios para la penetración al interior de las raíces de plántulas de *P. radiata*, lo que provoca un estrés detectado a nivel de eficiencia del fotosistema II, siendo este un sistema planta-patógeno útil en la evaluación de estrés y respuestas defensivas frente a patógenos de suelo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Departamento de Fisiología Vegetal, Laboratorio de Patología Forestal, Laboratorio de Cultivo In Vitro de Tejidos y al Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, A., L. DA SILVA, A. DE MELO, F. DAMATTA & A. COUTO. 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1831-1839.
- AMMON, V., T.D. WYLLIE & M.F. BROWN. 1974. A structural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Physiological Plant Pathology* 4: 1-4.
- AMMON, V., T.D. WYLLIE & M.F. BROWN. 1975. Investigation of infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55: 77-81.
- AYNARU, D.K.G. & R.J. GREEN. 1973. Alteration of germination patterns of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* on soil surfaces. *Phytopathology* 64: 595-601.
- BAIS, H. P., T.L. WEIR, L.G. PERRY, S. GILROY & J.M. VIVANCO. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233-266.
- BERGER, S., Z. BENEDIKTYOVÁ, K. MATOU, K. BONFIG, M.J. MUELLER & L. NEDBAL. 2007. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9: 17.
- BUTIN & H.L. PEREDO. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. J. Cramer, Berlin. 100 pp.
- CHOWDHURY, S., A. BASU, T.R. CHAUDHURI & S. KUNDU. 2014. In-vitro characterization of the behaviour of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. at the rhizosphere and during early infection of roots of resistant and susceptible

- varieties of sesame. *European Journal of Plant Pathology* 138: 361-375.
- DEISING, H.B., S. WERNER & M. WERNITZ. 2000. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* 2: 1631-1641.
- DHINGRA, O.D. & J.B. SINCLAIR. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Imprensa Universitaria, Universidade Federal de Viçosa. 166 pp.
- DI RIENZO, J.A., F. CASANOVES, M.G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA & C.W. ROBLEDO. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- HINOJOSA, J.C. 1997. Susceptibilidad de algunas especies forestales nativas chilenas a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Tesis. Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. 109 pp.
- HOWARD, R.J., M.A. FERRARI, D.H. ROACH & N.P. MONEY. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 11281-11284.
- KAUR, S., G. SINGH, S. KAUR, G.E. VALLAD, R. CHAND & V. BAHADUR. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38(2): 136-151.
- KOCAL, N., U. SONNEWALD & S. SONNEWALD. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology* 148: 1523-1536.
- LUQUE, J., M. COHEN, R. SAVÉ, C. BIEL & I.F. ÁLVAREZ. 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence, and growth of *Quercus suber* L. *Annals of Forest Science* 56: 19-26.
- MATERÁN, M.E., P.L. SÁEZ, M. SÁNCHEZ-OLATE, L.A. BRAVO, R. RODRÍGUEZ, D. RÍOS & R.E. COOPMAN. 2015. Photochemical efficiency during the establishment and consolidation phases of in vitro *Pinus radiata* micrograft made from scions of different ontogenetic age. *American Journal of Plant Sciences* 6: 228-239.
- MATYSIAK, B. & E. GABRYSEWSKA. 2016. The effect of in vitro culture conditions on the pattern of maximum photochemical efficiency of photosystem II during acclimatisation of *Helleborus niger* plantlets to ex vitro conditions. *Plant Cell, Tissues and Organ Culture* 125: 585-593.
- MAXWELL, K. & G.N. JOHNSON. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- MAZID, M., T.A. KHAN & F. MOHAMMA. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3(2): 232-249.
- MCCAIN, A.H. & R.F. SCHARPF. 1989. Effect of inoculum density of *Macrophomina phaseolina* on seedling susceptibility of six conifer species. *European Journal of Plant Pathology* 19: 119-123.
- MEYER, W.A. & J.B. SINCLAIR. 1974. Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. *Phytopathology* 64: 845-849.
- MUJICA, F. & C. VERGARA. 1980. Flora Fungosa Chilena. Ediciones Universidad de Chile, Santiago. 308 pp.
- MURCHIE, E.H. & T. LAWSON. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64(13): 3983-3998.
- MUÑOZ, H. 2006. Análisis espacial de la enfermedad "podrición carbonosa de la raíz" (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) en una plantación de *Pinus radiata* D. Don. Tesis. Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile. 25 pp.
- OKUBARA, P.A. & T.C. PAULITZ. 2005. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. *Plant and Soil* 274: 215-226.
- PAPAVIZAS, G.C. 1977. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 337-341.
- RAAIJMAKERS, J.M., T.C. PAULITZ, C. STEINBERG, C. ALABOUVETTE & Y. MOËNNE-LOCCOZ. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341-361.
- ROSENQVIST, E. & O. VAN KOOTEN. 2006. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In: J. R. DeEll & P.M.A. Toivonen (eds.), *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, pp 31-77. Springer editions, New York, USA.
- ŠEBELA, D., J. OLEJNÍČKOVÁ, A. ŽUPČANOVÁ & R. SOTOLÁŘ. 2012. Response of grapevine leaves to *Plasmopara viticola* infection by means of measurement of reflectance and fluorescence signals. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 8: 229-238.
- SHORT, G.E., T.D. WYLLIE & P.R. BRISTOW. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70: 13-17.
- SMITH, W.H. 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. *The Journal of Microbiology* 15: 1387-1391.
- SMITH, R.S., C.S. HODGES & C.E. CORDELL. 1989. Charcoal root rot and black root rot. In: C.E. CORDELL, R.L. ANDERSON, W.H. HOFFARD, T.D. LANDIS, R.S. SMITH & H.V. TOKO (eds.), *Forest nursery pest*, pp. 112-113. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., USA.
- SONGA, W. & R.J. HILLOCKS. 1996. Legume hosts of *Macrophomina phaseolina* in Kenya and effect of crop species on soil inoculum level. *Journal of Phytopathology* 144: 387-391.
- VALLADARES, F. & R.W. PEARCY. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeres arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* 20: 25-36.
- WAGNER, A., W. MICHALEK & A. JAMIOLKOWSKA. 2006. Chlorophyll fluorescence measurements as indicators of fusariosis severity in tomato plants. *Agronomy Research* 4: 461-464.