



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales-Programa de Magister en ciencias Forestales

**VARIABILIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Macrophomina phaseolina*
(Tassi) Goid. COLECTADOS DESDE VIVEROS Y PLANTACIONES DE
Pinus radiata D. Don
EN LA REGION DEL BIOBIO**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

GIANNINA ISABELLA ESPINOZA GALINDO
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Rodrigo Habún Zaror
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

VARIABILIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. COLECTADOS DESDE VIVEROS Y PLANTACIONES DE *Pinus radiata* D. Don EN LA REGION DEL BÍOBÍO

Comisión Evaluadora:

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor guía)

Ingeniero Forestal; Dr en Biología

Eugenio Sanfuentes Von Stowasser (Profesor co-guía)

Ingeniero Forestal; Dr en Fitopatología

José Luis Henríquez Sáez (Comisión evaluación)

Ingeniero Agrónomo; PhD.

Director de Postgrado:

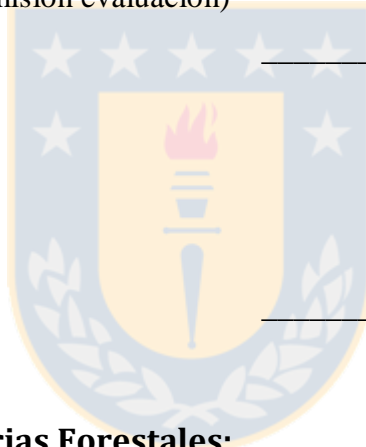
Regis Teixeira Mendonça

Ingeniero Químico, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate.

Ingeniero Forestal, Dr.



A Dios quien es el pilar fundamental en mi vida y gracias a él tuve la oportunidad de conocer al angelito más maravilloso que ilumino mi vida

A mis queridos padres Alessandra y David, por entregarme su amor, comprensión y ayuda durante todo este tiempo

A mis hermanos: Alexander, Karla e Ignacio y mi sobrina Roció, que nuestra unión permanezca por siempre con nachito cuidándonos desde el cielo.

A mi Mamy Juany, Tío Ramón y Tío Roberto, por su apoyo y preocupación en cada momento de mi vida

A mi amado Javier, por entregarme ese amor incondicional que me impulsa a seguir adelante con nuestros sueños

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Rodrigo Hasbún por su apoyo, confianza, comprensión, entusiasmo y entrega de conocimientos durante estos años, los cuales fueron indispensables para el desarrollo de esta tesis. A mi profesor co-guía Eugenio Sanfuentes por sus grandes aportes en el área de patología forestal, los cuales fueron la base fundamental de esta tesis. Al profesor asesor Juan Henríquez de la Universidad de Chile, quien dio muy buenos aportes en la defensa del proyecto de tesis, los que ayudaron a focalizar de mejor manera el tema de investigación. A INNOVA Biobío, por darme el financiamiento para desarrollar el proyecto “Certificación de sustratos libre de patógenos fúngicos” y parte de esta tesis.

Al personal de los Laboratorios Epigenética Vegetal y Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, por su buena disposición en colaborar en el desarrollo de este trabajo. Al Director de postgrado Regis Texeira, Secretaria de postgrado Margarita Figueroa, Profesores de postgrado, Decanato de la Facultad de Ciencias Forestales, así como a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por mostrar en cada momento su compromiso con el programa de Magister en Ciencias Forestales. A Blanquita por estar siempre dispuesta a prestarnos su ayuda cada vez que lo requerimos. A mis compañeros de laboratorio, Macarena Arellano, Gabriela Saavedra, Daniela Fernández, Joseline Valdés, Adrián Garrido, Camilo Gatica y Nicolás Figueroa, con quienes pase momentos muy gratos y gracias a su simpatía y compañerismo el ambiente de trabajo se hacía muy agradable. A los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Vegetal, Pablo Neira y Fernando Domínguez, quienes me ayudaron en el montaje del ensayo en el invernadero y en la evaluación de algunos resultados.

A mi familia que estuvo acompañándome tanto en los momentos gratos como difíciles y siempre me dieron una palabra de aliento para no decaer y seguir adelante con este proyecto. A mi pololo Javier por apoyarme y darme la fuerza para continuar con este desafío y muchos más que pensamos emprender juntos. A mi gran amigo Adrian que me apoyo en cada momento que lo necesite y entre nosotros nació una linda amistad que espero que dure por mucho tiempo. A mis amigas Natalia y Nicole, aunque no pasamos mucho tiempo juntas en esta etapa, siempre estuvimos pendiente de los logros y momentos difíciles durante el desarrollo de nuestras tesis.

En general a todas las personas que me apoyaron y me ayudaron al fin a terminar con esta etapa

MUCHAS GRACIAS

ABREVIATURAS

ADE: Agua destilada estéril

APD: Agar Papa Dextrosa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

AMOVA: Análisis de varianza molecular

ANOVA: Análisis de la varianza

BPD: Caldo de papa dextrosa

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

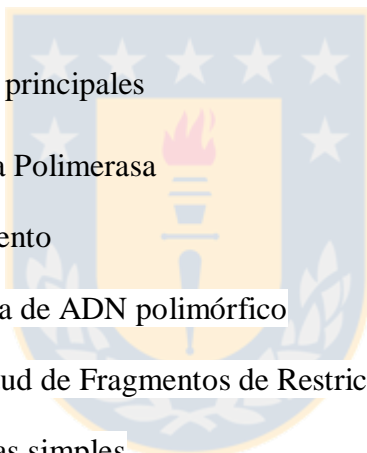
FDR: Tasa de falso descubrimiento

RAPD: Amplificación Aleatoria de ADN polimórfico

RFLP: Polimorfismos de longitud de Fragmentos de Restricción

SSR: Repeticiones de secuencias simples

UPGMA: Método de grupo no ponderado con media aritmética



INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Estructura genética de hongos fitopatógenos: variabilidad genética y potencial evolutivo	4
<i>Macrophomina phaseolina</i> un hongo patógeno emergente.....	6
Ciclo de vida y sintomatología	7
Factores ambientales predisponentes en el desarrollo de la enfermedad	9
Importancia económica de <i>M. phaseolina</i>	9
Variabilidad entre aislados de <i>M. phaseolina</i>	10
<i>M. phaseolina</i> en Chile.....	13
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
METODOLOGIA.....	16
Obtención de aislados de <i>M. phaseolina</i>	16
Aislamiento de <i>M. phaseolina</i> desde plántulas de <i>P. radiata</i> y suelo arenoso.....	18
Identificación del patógeno: Extracción de ADN y amplificación con partidores específicos.....	18
Caracterización Fenotípica	19
• Morfología de los aislados	19
• Sensibilidad a clorato.....	19
Variabilidad genética de aislados de <i>M. phaseolina</i>	20
• Análisis AFLPs	20
• Estructura genética y Diversidad genética intraespecífica e interpoblacional.....	20
Evaluación de agresividad de aislados de <i>M. phaseolina</i> en <i>P. radiata</i>	21
• Producción de inóculo	21
• Inoculación.....	22
• Siembra de <i>P. radiata</i> y condiciones del ensayo.....	22
• Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad	22
Análisis estadístico.....	23

RESULTADOS	24
Identificación de aislados colectados	25
Variabilidad Fenotípica	26
• Caracterización Morfológica.....	26
• Sensibilidad a clorato.....	30
Relaciones entre variables fenotípicas	32
Variabilidad genética presente en aislados de <i>M. phaseolina</i>	34
• Estructura genética inferida por agrupamiento bayesiano	34
• Estructura genética inferida por AMOVA y PCA	35
• Diversidad genética dentro de las poblaciones	37
• Análisis de BayeScan 2.1	38
Asociación entre variabilidad genética y fenotípica en <i>M. phaseolina</i>	40
• Variabilidad genética v/s morfología de la colonia	40
• Variabilidad genética v/s sensibilidad a clorato	42
Relación entre marcadores putativos bajo selección (medida de variabilidad genética) y variabilidad fenotípica en <i>M. phaseolina</i>	44
Ensayo de agresividad de <i>M. phaseolina</i> en <i>P. radiata</i>	45
• Emergencia de plántulas de <i>P. radiata</i>	45
• Condiciones de humedad y temperatura del suelo	46
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56
ANEXO.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamientos de <i>M. phaseolina</i> colectados en viveros y plantaciones de la Región del Biobío.....	24
Tabla 2. Parámetros generales de diversidad genética intraespecífica en <i>Macrophomina phaseolina</i> presente en las tres poblaciones generadas por el software Structure.....	38



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del patógeno <i>Macrophomina phaseolina</i> causante de la pudrición carbonosa de la raíz en <i>Pinus radiata</i>	8
Figura 2. Localización geográfica de los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> utilizados en este estudio	16
Figura 3. Esquema de la toma de plantas de <i>P. radiata</i> en viveros forestales y suelo arenoso en plantaciones. A: registros antiguos de focos de la enfermedad causada por <i>Macrophomina phaseolina</i> y B: Diagonal de 100 m en una plantación de <i>P. radiata</i> , cada 10 m se tomó una submuestra a 15 cm de profundidad.	17
Figura 4. Identificación de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> con los partidores MpKF y MpkR. M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1: aislado de <i>P. radiata</i> (43_P_N); 2, 7 y 8: aislado de <i>P. radiata</i> vivero Proplantas S.A (44_P_P, 45_P_P y 46_P_P); 3, 4 y 5: aislado de <i>Eucalyptus</i> spp. vivero San Ignacio (03_E_S, 04_E_S y 05_E_S); 6: aislado vivero San Ignacio (11_N_S); 9: aislado vivero Carlos Douglas y 14-19: aislado de <i>P. radiata</i> vivero Carlos Douglas.....	26
Figura 5. Morfotipos representativos de los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> crecidos en medio APD basados en el color del micelio. A: gris claro; B: gris y C: gris oscuro.....	27
Figura 6. Frecuencia de los tres morfotipos obtenidos a partir del color del micelio de la colonia en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia.	27
Figura 7. Frecuencia de los tres patrones generados por el crecimiento del micelio aéreo en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia.	28
Figura 8. Velocidad de crecimiento de la colonia en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia. Los valores con letras iguales no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).	29
Figura 9. Tamaño de microesclerocios en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia (p -valor ANOVA= 0,57).	30
Figura 10. Morfotipos representativos de los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> crecidos en medio que contiene clorato de potasio. A: restringido/ligero; B: ligero y C: denso.	30

Figura 11. Frecuencia de los tres morfotipos crecidos en medio modificado con clorato en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia.....	31
Figura 12. Velocidad de crecimiento de la colonia de los fenotipos clorato en los seis grupos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> agrupados en función de la especie y/o procedencia	32
Figura 13. Relación entre variables fenotípicas, patrones de crecimiento del micelio aéreo y morfotipos de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> crecido en medio de clorato.....	33
Figura 14. Relación entre variables fenotípicas, velocidad de crecimiento de la colonia y velocidad de los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> crecidos en medio clorato.	33
Figura 15. Probabilidad posterior de Log (LnP[D]) y valores del delta K (método de Evanno) contra K (número de grupos poblacionales), obtenido de los datos entregados por Structure y analizados en Structure Harvester.....	34
Figura 16. Estimación de subpoblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> . Cada individuo es representado por una barra de colores divididos en K grupos según los cluster encontrados (tres en este estudio). Cada número representa el grupo de aislados en función del hospedero y/o procedencia. Eucalipto (1); frutilla y frangel (2); vivero Carlos Douglas y La Posada (3); plantaciones de pino (4); vivero San Isidro (5) y vivero Proplantas (6).	35
Figura 17. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> de acuerdo al software Structure.	36
Figura 18. Genotipificación de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> mediante análisis de componentes principales en software Gen Alex.....	37
Figura 19. Análisis en BayScan para los 102 marcadores AFLPs provenientes de tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> . El marcador específico Fst representa frente a las probabilidades posteriores (PO) de estar bajo selección. La línea vertical muestra el PO de 10 utilizada para identificar los marcadores atípicos (outliers).....	39
Figura 20. Frecuencia alélica de cada marcador bajo selección putativo presente en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i>	39
Figura 21. Frecuencia de los tres morfotipos obtenidos a partir del color del micelio de la colonia presente en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generado por el software Structure.	40

Figura 22. Frecuencia de los tres patrones generados por el crecimiento del micelio aéreo en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generadas por el software Structure.	41
Figura 23. Velocidad de crecimiento de la colonia en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generadas por el software Structure (p-valor Anova= 0,12).	41
Figura 24. Tamaño de microesclerocios en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generadas por el software Structure (p-valor= 0,06).	42
Figura 25. Frecuencia de los tres morfotipos crecidos en medio modificado con clorato en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generadas por el software Structure....	43
Figura 26. Velocidad de la colonia de los fenotipos clorato en las tres poblaciones de <i>Macrophomina phaseolina</i> (K=3) generadas por el software Structure (p-valor ANOVA= 0,13).	43
Figura 27. Relación entre el Locus 16 con la variable morfológica del patrón de crecimiento del micelio aéreo presente en aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i>	44
Figura 28. Relación entre el Locus 53 con el morfotipo de los aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> crecido en medio clorato.	45
Figura 29. Emergencia de plántulas de <i>Pinus radiata</i> en cada tratamiento correspondientes a aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> y tratamiento control.	46
Figura 30. Humedad del suelo tomada antes y después de cada régimen de riego (día por medio, cada dos, cuatro y siete días) durante el transcurso del ensayo de agresividad.	47
Figura 31. Comportamiento de la Temperatura (°C) semanal del suelo, tomada en tres tiempos: mañana, tarde y tarde-noche durante el transcurso del ensayo de agresividad.	47
Figura 32. Mortalidad acumulada de plántulas de <i>Pinus radiata</i> causada aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> (C2 a C8). Letras iguales no difieren significativamente (p>0,05).	48
Figura 33. Grado de colonización de raíces de plántulas asintomáticas de <i>Pinus radiata</i> causada por aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> correspondientes a los tratamientos C2 a C8 más el control del ensayo. Letras iguales no difieren significativamente (p>0,05).	49

RESUMEN

El hongo patógeno *Macrophomina phaseolina*, causa enfermedad en varios cultivos agrícolas y forestales. Presenta amplia variabilidad genética, adaptándose a diferentes condiciones ambientales lo que sustentaría su amplia distribución geográfica. En Chile, ha causado mortalidad de plántulas en viveros forestales e incluso se han detectado plantas muertas por *M. phaseolina* en plantaciones. Se presume que se trataría de plantas asintomáticas que salen infectadas desde los viveros, sin embargo no existen mayores antecedentes. Algunos estudios han mostrado diversidad morfológica y patogénica entre aislados de ambas fuentes, sin mostrar patrones claros de divergencia. En este trabajo se pretende estudiar la variabilidad genética presente en aislados de *M. phaseolina*, colectados desde viveros y plantaciones de *P. radiata* y al mismo tiempo ver si esta diversidad tiene relación con las características fenotípicas y patogénicas. Se colectaron aislados provenientes de plántulas y suelo arenoso de viveros y plantaciones de *P. radiata*. La descripción morfológica de la colonia fue basada en el color de micelio, presencia de micelio aéreo, tamaño de microesclerocios y velocidad de la colonia, además se realizó un ensayo de sensibilidad a clorato. La variabilidad genética a nivel molecular fue determinada por marcadores AFLPs. Además se estudió la agresividad de algunos aislados mediante inoculaciones controladas en sustrato. Los aislados de *M. phaseolina*, colectados en el vivero C. Douglas de Forestal Mininco S.A y plantaciones de la misma empresa presentaron distintos morfotipos del color de micelio y patrones del micelio aéreo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y tamaño de microesclerocios, Existe una alta variabilidad genética, entre los aislados del vivero y plantaciones, los que fueron separados en dos grupos genéticos. Los aislados de pino del vivero Carlos Douglas fueron más agresivos, seguido por los de Proplantas y San Isidro. Algunos marcadores putativos que se encontrarían bajo selección, se relacionaron con algunas características fenotípicas. El resto de los aislados también presentaron divergencia fenotípica y genética, y no fue posible relacionar el grupo genético con la procedencia y tampoco con las características fenotípicas.

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina, it is a fungal pathogen that causes disease in various agricultural and forestry crops. It presents a wide genetic variability, adapting to different environmental conditions which would sustain its wide geographical distribution. In Chile, has caused mortality of seedlings in nurseries and even dead plants were been detected by *M. phaseolina* in forest plantations. It is presumed that asymptomatic infected plants would be leaving from the nurseries, but there are not more records about this. Some studies have shown morphological and pathogenic diversity among isolates from both sources, not showing clear patterns of divergence. This paper aims to study the genetic variability present in isolates of *M. phaseolina*, collected from nurseries and plantations of *P. radiata* and at the same time see if this diversity is related to phenotypic and pathological characteristics. Isolates were collected from seedlings and from sandy soil from nursery and plantation of *P. radiata*. The morphological description of the colony was based on the color of mycelium, aerial mycelium presence, microsclerotia size and speed of the colony, also an chlorate sensitivity assay was performed. The genetic variability at the molecular level was determined by AFLP markers. Besides, the aggressiveness of some isolates it was studied using controlled inoculations on substrate. *M. phaseolina* isolates, collected in the C. Douglas nursery of Forest Mininco SA and plantations of the same company presented different morphotypes of mycelium color and patterns of aerial mycelium. However, no significant differences were observed in the speed of growth and size of microsclerotia. There is a high genetic variability among the isolates of nursery and the plantations, which were separated into two genetic groups. Isolated of pine from the Carlos Douglas nursery were the most aggressive, followed by those of Proplantas and San Isidro. Some putative markers that would be found under selection were associated with some phenotypic characteristics. The remaining isolates also showed phenotypic and genetics divergence and it was not possible to relate the genetic group with the source, neither with the phenotypic characteristics.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enfermedades y plagas que afectan la producción forestal en Sudamérica se han expandido notablemente, siendo, las enfermedades uno de los factores principales que determinan la dinámica de los ecosistemas forestales junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Los principales agentes causantes de enfermedades forestales son los hongos, quienes afectan diferentes partes de las plantas, dañando de esa forma su funcionamiento normal. La mayoría de los hongos tienen reproducción sexual y asexual, lo cual les permite sobrevivir bajo distintas condiciones ambientales y ocasionar importantes problemas fitosanitarios que dependen en gran medida de su variabilidad (Pildain y Errasti 2011).

Las enfermedades en viveros y plantaciones forestales es un evento constante y es posible reducir su impacto mediante la selección de genotipos resistentes, manejo silvícola, y la utilización de otras medidas de prevención y control (Control de tipo físico, químico y biológico) (Braga et al. 2003; Labrada 1995; Civerolo et al. 1993; Pérez 2004; Rivera 2007). Entre estas medidas de control para las enfermedades forestales se destaca el mejoramiento genético que se basa en la diversidad que presentan las plantas, ya sea por procesos naturales o provocadas por el hombre. En genotipos silvestres o parientes cercanos, existe una gran diversidad que sirve como fuente de búsqueda de genes de resistencia. Otra fuente son las numerosas variedades locales, cultivadas por muchos años en regiones geográficas específicas y expuestas a la selección natural o la realizada por el hombre (Rivera 2007). Actualmente existe evidencia de altos y moderados niveles de resistencia en especies arbóreas, por el contrario existe escasa información acerca de la variación genética de los patógenos y su potencial evolutivo

El conocimiento de la variabilidad genética y patogénica de las poblaciones de hongos fitopatógenos, constituye una información de gran relevancia para la aplicación eficaz de las estrategias de control de enfermedades, como es el caso de la utilización de cultivares tolerantes o resistentes, en donde la eficacia del control puede ser afectada por la variabilidad que presentan las poblaciones de patógenos.

La presencia de diferentes razas y patotipos pueden hacer inefectiva la resistencia completa, al igual que las condiciones ambientales favorables y ciertas prácticas silviculturales. Consecuentemente, el éxito del mejoramiento genético en especies arbóreas contra enfermedades, requieren de un conocimiento adecuado sobre la estructura, variabilidad genética y potencial evolutivo de la población del patógeno (Pallas et al. 2007, Macias et al. 2006).

Estructura genética de hongos fitopatógenos: variabilidad genética y potencial evolutivo

La estructura genética es la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones y es consecuencia de las interacciones entre cinco fuerzas evolutivas mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección. Este tipo de conocimiento da una idea de los procesos evolutivos que conformaron una población en el pasado y permite diferenciar entre la diversidad genética y genotípica. La diversidad genética se refiere al número de alelos en locus individuales en una población, incrementándose a medida que los alelos aumentan y las frecuencias relativas de esos alelos se hacen iguales. Por otro lado, la diversidad genotípica se refiere al número y frecuencias de genotipos o individuos genéticamente distintos en una población. La diversidad genotípica es un concepto importante para los fitopatógenos que tienen un componente significativo de reproducción asexual en su ciclo de vida (McDondal y Linde 2002). El conocimiento sobre la estructura genética de las poblaciones de patógenos, es necesario para poner en práctica estrategias de control eficientes, debido a que los patógenos evolucionan para lograr adaptarse constantemente a los cambios ambientales. En los sistemas agrícolas, estos cambios ambientales son atribuidos a variedades resistentes, aplicación de fungicidas y fertilizantes, riego y rotación de cultivos (McDonald y Linde 1997).

La diversidad genética de una especie puede existir en tres diferentes niveles: diversidad genética dentro de los individuos, a menudo referida como heterocigocidad, diversidad genética entre individuos dentro de una población y variaciones genéticas entre poblaciones. Entonces la diversidad genética puede ser definida en términos generales como las variaciones heredables observadas dentro y entre poblaciones de organismos (Krishnamurthy 2003). Conocerla es vital para la conservación, mejoramiento genético, sustentabilidad y la

productividad ya sea pecuaria, pesquera, agrícola y forestal (Piñero et al.2008). La presencia de diversidad genética en los hongos, puede ser generada por varios mecanismos que permiten garantizar la sobrevivencia de su progenie. Existen ciertos mecanismos que dan origen a la variabilidad genética en hongos, las cuales son conocidos en forma general como parasexualismo e incluyen principalmente: heteroploidia, heterocariosis, recombinación somática y segregación (Gonzales y Simpson 1997, Rivera 2007). La diversidad genética puede evaluarse en los hongos mediante la observación de distintas características morfológicas como: nivel de organización celular, características del talo, micelio, forma, septos, aspecto, color, consistencia entre otros. Alguno de estos caracteres son estables, sin embargo la mayoría resultan ser variables, debido a que son fuertemente influenciados por el medio ambiente. Por el contrario la característica fisiológica más utilizada para clasificar especies de fitopatógenos, es su propiedad de expresar diferencias en su capacidad para causar enfermedad. Cuando estas diferencias son entre especies se les nombra como: variantes o formas y cuando es entre variedades de una misma especie se conocen como: razas fisiológicas, razas patogénicas, patotipos o simplemente razas (Gonzales y Simpson 1997).

Los hongos al ser un grupo complejo y difícil de estudiar, no resulta fácil delimitar individuos, ya que sus poblaciones pueden presentar sistemas de reproducción sexual, asexual o mixto. Actualmente, existe un avance considerable en el desarrollo de métodos innovadores para analizar a los hongos a nivel molecular, como los marcadores moleculares. Estos marcadores detectan polimorfismos en genes u otras secuencias no codificantes y se detectan a nivel del ADN. Por otra parte, no son influenciados por el ambiente, presentan amplia cobertura del genoma, alto nivel de polimorfismo, entre otros. Dentro de estos marcadores están aquellos que se basan en técnicas de hibridación molecular más restricción como RFLP, amplificación por PCR como RAPD y SSR, PCR más restricción como AFLP y secuenciación (Azofeifa 2006).

El conocimiento de la estructura genética también ofrece una visión del potencial evolutivo de las poblaciones de patógenos, la cual condiciona la durabilidad de los programas de control de enfermedades. Los patógenos con mayor potencial evolutivo poseen un mayor riesgo de eludir los efectos de los principales genes de resistencia o evolucionar para contrarrestar otros métodos de control como aplicaciones de fungicidas o antibióticos. El conocimiento del

potencial evolutivo de patógenos puede ser útil para optimizar el manejo de los genes de resistencia, fungicidas, y antibióticos, minimizando de esta forma las pérdidas que resultan de la poca eficiencia de los métodos de control. McDonald y Linde (2002) describieron un “modelo de riesgo” que relaciona la capacidad de causar enfermedad por parte de un fitopatógeno con la estructura genética de sus poblaciones. Este mayor o menor potencial evolutivo es el reflejo de la estructura genética de las poblaciones del patógeno, la cual viene determinada por la historia evolutiva de esa población y es consecuencia de la interacción de los 5 factores que condicionan la evolución (Pallas et al. 2007). Varios de los patógenos más destructivos y peligrosos presentan una combinación de ciclos sexuales y asexuales que permiten generar altos niveles de diversidad genética. En el caso de la fase sexual, se pueden generar nuevas combinaciones de alelos que pueden ser la presencia de nuevos genes de resistencia a fungicidas. En la fase asexual los genotipos más aptos se mantienen a través de una reproducción clonal y pueden aumentar su frecuencia, en donde las líneas clonales dependen fuertemente de las capacidades de dispersión y supervivencia de los propágulos asexuales (Pérez 2004, McDonald y Linde 2002).

***Macrophomina phaseolina* un hongo patógeno emergente**

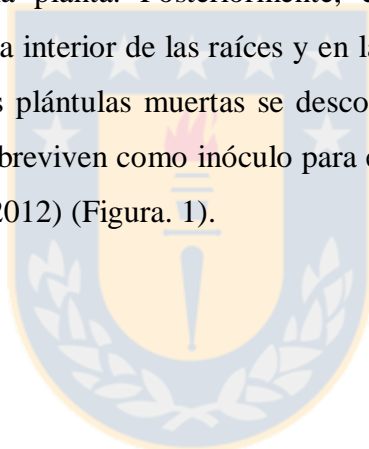
Pertenece a la división Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Botryosphaeriales, familia Botryosphaeriaceae, género monotípico *Macrophomina*, cuya única especie reportada es *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Crous et al. 2006). Recientemente, en Senegal fue determinada una nueva especie en el género, denominada *Macrophomina pseudophaseolina* teniendo como hospederos *Abelmoschus esculentus*, *Arachis hypogaea*, *Hibiscus sabdarifa* y *Vigna unguiculata* (Sarr et al. 2014).

La taxonomía de *M. phaseolina* ha sido revisada frecuentemente en los últimos 100 años, dando lugar a las siguientes sinonimias: *Macrophoma phaseolina* Tassi, 1901; *Macrophomina phaseoli* (Maubl) Ashby, 1927; *Macrophoma phaseoli* Maubl., 1905; *Macrophoma chorchori* Sawada, 1916; *Macrophomina philippensis* Petr., 1923; *Macrophoma cajani* Syd & Bull., 1916; *Macrophoma sesami* Sawada, 1922; *Sclerotium bataticola* Taub., 1913; *Rhizoctonia lamellifera* Snall, 1924; *Dothiorella cajani* Syd & Bull., 1925 (Kaur et al. 2012). Existe un reporte no confirmado de un teleomorfo llamado *Orbilbia obscura* (Ghosh et al. 1964), sin

embargo desde entonces no hay ninguna evidencia que confirme la presencia de fase sexual en *M. phaseolina* (Mihail 1992).

Ciclo de vida y sintomatología

El patógeno sobrevive como pequeños y negros microesclerocios en el suelo y restos de plantas infectadas. Cuando una raíz en crecimiento de una planta susceptible entra en contacto con los microesclerocios en el suelo, estos dejan su estado inactivo y germinan. Luego, el hongo crece sobre la superficie de la raíz y penetra por las células epidérmicas en la corteza de la raíz, colonizando a través de la corteza, corteza interna y hasta la raíz principal. La destrucción gradual del sistema radicular provoca un retardo en el crecimiento, clorosis foliar y finalmente la muerte de la planta. Posteriormente, el hongo forma microesclerocios pequeños y negros en la corteza interior de las raíces y en la parte inferior del tallo. A medida que el tallo y las raíces de las plántulas muertas se descomponen, los microesclerocios son liberados en el suelo, donde sobreviven como inóculo para el cultivo de la próxima temporada (Smith et al. 1989, Kaur et al. 2012) (Figura. 1).



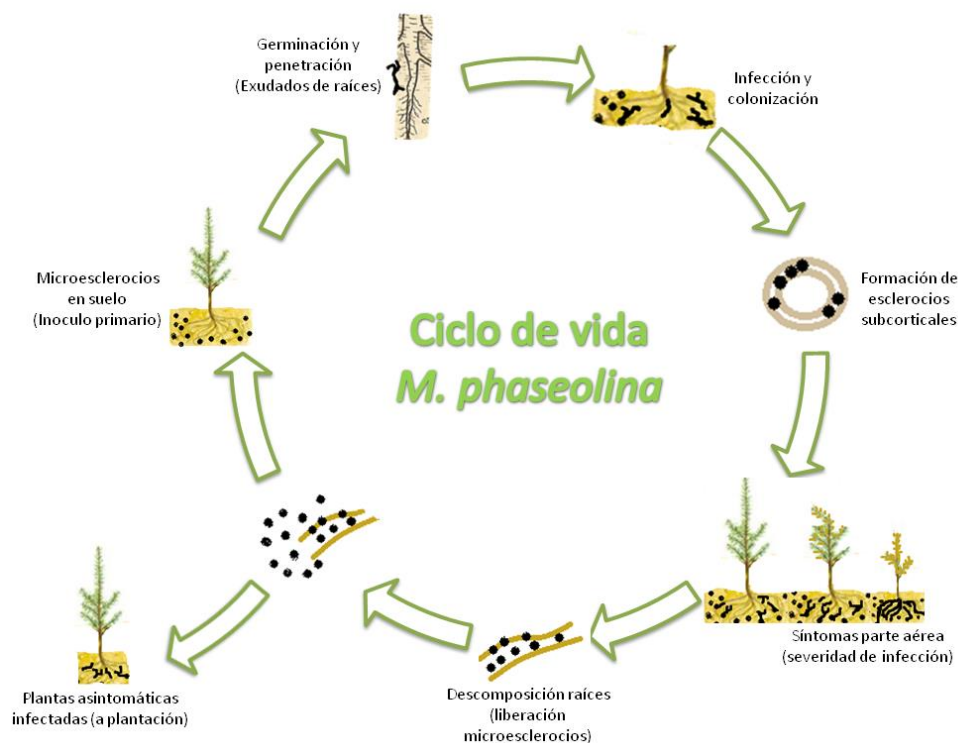


Figura 1. Ciclo de vida del patógeno *Macrophomina phaseolina* causante de la pudrición carbonosa de la raíz en *Pinus radiata*.

Los síntomas que experimenta la parte aérea de las plantas de pino, son característicos de muchas enfermedades radiculares y se manifiestan por clorosis, marchitez y muerte. Los síntomas de la raíz no siempre se relacionan con los del follaje, siendo común que plantas que presentan una avanzada sintomatología radicular no muestren síntomas en la parte aérea, ya que las plantas se encontrarían en condiciones óptimas de nutrición y humedad (Hinojosa 1997).

Los síntomas distintivos que causa este agente patógeno en el sistema radicular son zonas de tejidos ennegrecidos y engrosados en la raíz central y raíces laterales. Los engrosamientos resultarían a partir de la multiplicación de las células del felodermo. En tejidos sanos el felodermo está constituido por dos a tres capas de células rectangulares, sin embargo, los tejidos enfermos muestran 10 a 30 capas. Además, sobre las porciones muertas de la raíz principal, se forman raíces secundarias que también pueden ser infectadas (Hodges 1962).

Factores ambientales predisponentes en el desarrollo de la enfermedad

Los factores ambientales que determinan la severidad de la enfermedad son altas temperaturas y sequía (Norton 1953). En cultivares de soya, el manejo del agua puede tener un efecto significativo en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo puede limitar pero no impedir la colonización de las raíces por *M. phaseolina* (Kendig et al. 2000). La humedad en el suelo juega un rol importante en reducir la resistencia al calor de los esclerocios y contribuye a la destrucción del contenido esclerocial (Dhingra y Sinclair 1974).

En plántulas de pino, existe una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y los incrementos de la temperatura del suelo dentro del rango de 21 a 38°C, observaciones realizadas a nivel de campo indican que esta enfermedad es más severa durante el verano cuando aumenta la temperatura del suelo (Hodges 1962). La mortalidad de plántulas de *Pinus* sp en viveros forestales a causa de *M. phaseolina*, ha sido más severa en plantas que se encontraban bajo condiciones de altas temperaturas del suelo y estrés hídrico (Reuvent y Madar 1985). En especies forestales nativas Chilenas, cuando la temperatura del suelo se elevó por sobre los 34°C la tasa de mortalidad aumenta considerablemente (Hinojosa 1997).

Importancia económica de *M. phaseolina*

Este fitopatógeno causa enfermedad en más de 500 cultivos y especies silvestres, incluyendo varios cultivos económicamente importantes, como legumbres y vegetales, y pudrición del tallo y raíz en bosques de coníferas, árboles frutales y malezas. Es considerado un problema de alto impacto en países tropicales y subtropicales con climas áridos y semiáridos en África, Asia, Europa, Norteamérica y Sudamérica. Además, se encuentra entre las cinco enfermedades más importantes en soya, provocando enormes pérdidas económicas anuales en los diez principales países productores de soya (Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay, Canadá, Indonesia, Bolivia e Italia en 1998). En EE.UU se estima que la supresión del rendimiento de los cultivos de soya fue de 1,98, 0,28 y 0,49 millones de toneladas métricas en el año 2003, 2004 y 2005, respectivamente. Por otro lado, en el año 2009 se confirmó problemas de *M. phaseolina* en fresa en los condados de Fresno y Alameda en California, EEUU (Kaur et al. 2012). En Tunisia (Boulila y Mahjoub 1994), Egipto (Ghoneim et al.

1996), Europa y en la región Mediterránea (Sánchez et al. 1996), las pérdidas en el rendimiento del ajonjolí han sido cercanos al 57% y causa graves daños en aceitunas (Maiti et al. 1988). Otro país que se ha visto fuertemente afectado por este agente patógeno es Kenia, en donde las pérdidas en el rendimiento de *Phaseolus vulgaris* fueron estimadas hasta 300 kg/ha.

La “pudrición carbonosa de la raíz” es una enfermedad ampliamente conocida por afectar principalmente cultivos agrícolas, sin embargo se han reportados varias pérdidas en importantes especies forestales como *Pinus* sp. Entre los años 1950-1960 fue reportada en viveros de pino en el estado de Florida (USA), causando importantes pérdidas en las especies *Pinus elliottii* Engelm y *P. taeda* L (Seymour 1969) y se ha determinado su participación en damping-off tardío principalmente en *P. lambertiana* (Smith 1970). Viveros de Este de USA fueron cerrados a causa de los severos ataques en la producción de con *P. elliotti*, *P. taeda*, *P. palustris* y *P. echinata* (Hodges 1962). En un vivero de Florida (USA) se reportaron pérdidas de 20 millones de plántulas de pino durante el año 1976 atribuidas a la pudrición carbonosa de la raíz (Seymour y Cordell 1979). Aunque *M. phaseolina* ha sido observada en asociación con la mortalidad de plantaciones de pino, la pudrición carbonosa de la raíz es mayormente una enfermedad de pinos en viveros forestales (Barnard y Gilly 1986).

Variabilidad entre aislados de *M. phaseolina*

Aislados de *M. phaseolina* colectados desde especies agrícolas, presentan una amplia variabilidad morfológica, fisiológica, patogénica y genética, la cual ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales y tener una amplia distribución geográfica (Muñoz et al. 2004). Diversas investigaciones sugieren que aislados de *M. phaseolina* provenientes de diferentes regiones geográficas presentan variaciones en su morfología y virulencia (Aboshosha et al. 2007; Kaur et al. 2013; Mihail y Taylor 1995; Iqbal y Mukhtar 2014). Del mismo modo, aislados obtenidos desde diferentes especies de plantas difieren en sus caracteres morfológicos en medio de cultivo y patogenicidad. Por otra parte, *M. phaseolina* muestra un alto grado de variabilidad en cuanto a la morfología de las colonias en medio de cultivo, como color de micelio, presencia de micelio aéreo, producción y tamaño de microesclerocios, velocidad de crecimiento y sensibilidad a clorato. Martínez y Laurentin (2012) caracterizaron fenotípicamente siete aislados de *M. phaseolina* provenientes de ajonjolí

en Venezuela, observando variabilidad en la velocidad de crecimiento, producción de microesclerocios y presencia de micelio aéreo, no así en el color del micelio que no presentó variación (gris oscuro). Debido a la dificultad, para clasificar los aislados de este fitopatógeno, a causa de su alta variabilidad los estudios continúan, ya que su conocimiento es considerado esencial para diseñar estrategias de manejos y control de la enfermedad.

Varios estudios para clasificar los aislados de *M. phaseolina* han sido centrados en la morfología de las colonias en medios modificados con clorato (Su et al. 2001). La mayoría de los hongos pueden utilizar nitrato como fuente de nitrógeno y su asimilación metabólica es por la reducción de nitrato a nitrito a través de la enzima nitrato reductasa, la cual también reduce el nitrito a amoníaco (McCain y Smith 1972). La enzima nitrato reductasa también puede reducir el clorato a clorito y la acumulación de clorito resulta ser tóxico para las células. Los aislados de hongos que tienen la enzima funcional son clorato sensibles, mientras que aquellos que son incapaces de catabolizar nitrato son resistentes a clorato. Así por ejemplo, los aislados de *M. phaseolina* obtenidos desde maíz y soya presentan diferencias en su sensibilidad a clorato. Aislados de soya resultan ser sensibles al clorato y su crecimiento es inhibido en un medio con clorato. Esto se podría deber a su eficiente asimilación de nitrógeno gracias a la alta actividad de la enzima nitrato reductasa. Por el contrario, los aislados de maíz son resistentes al clorato y con un patrón de crecimiento denso, debido a la baja actividad enzimática de la enzima (Pearson et al. 1986).

Investigadores de países en Sudamérica, Norteamérica y Asia Central han centrado sus esfuerzos en el estudio de la diversidad genética presente en *M. phaseolina*, al ser considerado uno de los patógenos de suelo más dañinos en cultivos de importancia comercial. La mayoría de los estudios evidencian un alto nivel de polimorfismo entre aislados de *M. phaseolina* obtenidos de distintos hospederos y localidades o países, sin embargo, no ha sido posible correlacionar la variabilidad genética con el origen geográfico o especies hospederas (Reyes et al. 2006; Beas et al. 2004; Muñoz et al. 2004; Mahdizadeh et al. 2011). Sin embargo, algunos estudios han obtenido esta relación con el genotipo. Martínez y Laurentin (2012) diferenciaron aislados del patógeno colectados en el margen izquierdo del río Aconcagua de aislados colectados en el margen derecho del canal. Das et al. (2008), constataron que aislados provenientes de una misma localidad mostraron una cierta tendencia a agruparse. En un

estudio en México, los aislados colectados en el país fueron morfológicamente diferentes a los aislados extranjeros (Beas et al. 2006). Por el contrario, no se ha podido observar alguna relación entre la agresividad de los aislados y su origen geográfico (Beas et al. 2004) y tampoco entre el tamaño de microesclerocios y virulencia, sin embargo han sugerido que *M. phaseolina* puede basar su capacidad patogénica en la producción de abundantes microesclerocios (Beas et al. 2006).

Algunos estudios se han enfocado en evaluar una posible relación entre la sensibilidad a clorato con la variabilidad genética y patogenicidad de aislados en *M. phaseolina*. Das et al. (2008), obtuvieron que los aislados de *M. phaseolina* sensibles a clorato fueron genéticamente más cercanos en el dendograma que los resistentes al clorato y causaron mayor enfermedad. Los aislados sensibles al clorato fueron agrupados en dos grupos vecinos, mientras que los aislados resistentes fueron esparcidos en diferentes grupos del dendograma. Por otro lado, los aislados sensibles a clorato mostraron mayor tendencia a provocar más enfermedad que los resistentes. Una de las razones puede ser la capacidad que tienen los aislados sensibles en la utilización del nitrato en conjunto con otras fuentes de nitrógeno disponibles en la planta como la savia, lo cual podría haber ayudado en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, dos aislados resistentes al clorato desarrollaron más enfermedad que los sensibles, lo cual indicaría que hay otros factores del huésped, además de la utilización de nitrato que estarían influyendo en la enfermedad causada por este patógeno. Es la primera vez que se demuestra que la sensibilidad a clorato en *M. phaseolina* tiene una cierta relación con severidad de la pudrición carbonosa en sorgo

A la fecha, solo se han realizados estudios moleculares en aislados provenientes de especies agrícolas de interés comercial, en donde se ha obtenido una amplia variabilidad genética utilizando marcadores moleculares. En estos estudios se han utilizado aislados de *M. phaseolina* provenientes de distintos hospederos, por lo tanto es lógico esperar una alta variabilidad genética y más aún si existe algún mecanismo de especialización de hospederos en *M. phaseolina*. La asociación con una especie hospedera durante un periodo de tiempo prolongado puede causar una adaptación a los compuestos nitrogenados disponibles en los hospederos y los individuos de esta población podrían ser más adecuados para colonizar sus respectivos huéspedes (Pearson et al. 1986). Numerosos estudios han tratado de demostrar la

existencia de algún tipo de relación entre la variabilidad genética, fenotípica y patogénica presente en *M. phaseolina*.

***M. phaseolina* en Chile**

El primer reporte de *M. phaseolina* en nuestro país, fue en la zona de Santiago en cultivos de soya (*Glycine max*) y poroto (*Phaseolus Vulgaris*) (Mujica y Vergara 1980). Posteriormente, este patógeno fue detectado en *Pinus radiata* en el año 1983 (Butin y Peredo 1986) y desde entonces ha sido detectado en numerosos viveros convirtiéndose en un importante problema sanitario. En los últimos años, la diseminación de este patógeno ha sido detectado tanto en viveros como en plantaciones (Gacitúa et al. 2009). Se ha planteado que desde viveros con presencia del patógeno puede ocurrir que plantas infectadas asintomáticas son llevadas a plantación en sitios cálidos, donde continúa el proceso de enfermedad. La muerte en plantación puede ocurrir varios años después especialmente cuando las plantas son expuestas a estrés, como falta de agua. Contrariamente, el hongo cesaría su desarrollo en las plantas instaladas en sitios fríos muriendo el patógeno gradualmente. Existen antecedentes de pérdidas recurrentes en viveros forestales en la región del Biobío, como el caso del vivero “Velenunque” de propiedad de Forestal Chile S.A. Este vivero, registro en el año 1987 una alta mortalidad en plantas de *P. radiata* provocado por *M. phaseolina*. Este comportamiento se repitió durante varias temporadas sucesivas, lo que determino su cierre (Hinojosa 1997) A la fecha, los estudios en el país se han centrado en la caracterización morfológica, patogénica y control biológico de *M. phaseolina* (Hinojosa 1997, Bedwell 2005, Valiente et al. 2008, Gacitúa et al. 2009, Gacitúa et. al 2010, Gacitúa et al. 2013). Solo existe un reporte de la variabilidad morfológica y patogénica presente en aislados de *M. phaseolina* colectados en viveros y plantaciones forestales, en el cual, se observaron diferencias significativas en las características morfológicas y patogénicas, incluso entre cepas recolectadas y aisladas del mismo lugar geográfico y tejido vegetal (Bedwell 2005). De esta forma, parece necesario efectuar un estudio a nivel molecular para conocer la estructura genética de este patógeno y si se relaciona con características morfológicas y en agresividad en especies forestales.

Actualmente *M. phaseolina* causa problemas menores en viveros forestales, sin embargo en un futuro la pudrición carbonosa de la raíz podría convertirse en un serio problema a causa del

efecto del cambio climático. El calentamiento global en los últimos 50 años ha sido mayor que el de cualquier periodo durante por lo menos los últimos 1300 años y los cambios observados en el clima incluyen eventos extremos como sequías, lluvias torrenciales, ondas de calor e intensidad de los ciclones tropicales. Los escenarios futuros proyectan que para las próximas dos décadas el calentamiento puede ser de aproximadamente 0,2°C por década y que para el 2100 la temperatura puede incrementarse entre 1,8 a 4 °C por sobre del promedio de 1980-1999 (Conde y Saldaña 2007). La Seremi del Medio Ambiente de la Región del Biobío advirtió que en la zona, y en la provincia de Ñuble, ya se comienzan a sentir los primeros efectos del cambio climático. Precipitaciones esporádicas, ríos con menos caudal y aumento de las temperaturas en dos grados en la región son algunos de las observaciones sobre los cuales las autoridades han puesto atención (La Discusión 2013). Por lo tanto, es posible predecir que existirán mejores condiciones ambientales para que *M. phaseolina* incremente las pérdidas en la producción de especies forestales y agrícolas. A la fecha en Chile hay 2, 41 millones de hectáreas de plantaciones forestales, donde tres especies concentran el 92,9% de la superficie: *Pinus radiata*, *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*, siendo la primera de ellas la de mayor cobertura con 1, 47 millones de hectáreas. La Región del Bío-Bío concentra el 38,1% de la superficie nacional plantada y al mismo tiempo es la región que lidera en cada una de las tres especies señaladas (INFOR 2014).

HIPÓTESIS

“Aislados de *Macrophomina phaseolina* obtenidos desde el suelo y plantas en viveros y plantaciones de *Pinus radiata* en la Región del Biobío, son genéticamente distintos, y dicha diferenciación se relaciona con las características fenotípicas y de agresividad en *P. radiata*”

OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad genética, fenotípica y patogénica en aislados de *Macrophomina phaseolina* provenientes de viveros y plantaciones de *Pinus radiata* en la Región del Bío-Bío.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la variabilidad fenotípica y genética de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a *Pinus radiata* en función de distintas localidades de colecta.
- b. Determinar la agresividad de aislados específicos de *Macrophomina phaseolina* en plántulas de *P. radiata*
- c. Relacionar la variabilidad genética de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a *Pinus radiata* con la variabilidad fenotípica y en agresividad.

METODOLOGIA

Obtención de aislados de *M. phaseolina*

Los aislados de *M. phaseolina* fueron obtenidos en enero y febrero de 2013, a partir de plántulas de *P. radiata* cultivadas a raíz desnuda con síntomas de la pudrición carbonosa, desde los viveros Carlos Douglas (Forestal Mininco S.A) y Proplantas S.A. También se colectaron muestras de suelo provenientes de plantaciones de *P. radiata* desde los predios Cerro verde (Plantación año 2012), Tres marías (Plantación año 2010), Tapihue (Plantación año 2011) y Colicheu (Plantación año 2011) pertenecientes a Forestal Mininco S.A y de suelo arenoso en vivero La Posada (Bosques de Arauco S.A) (Figura 2).

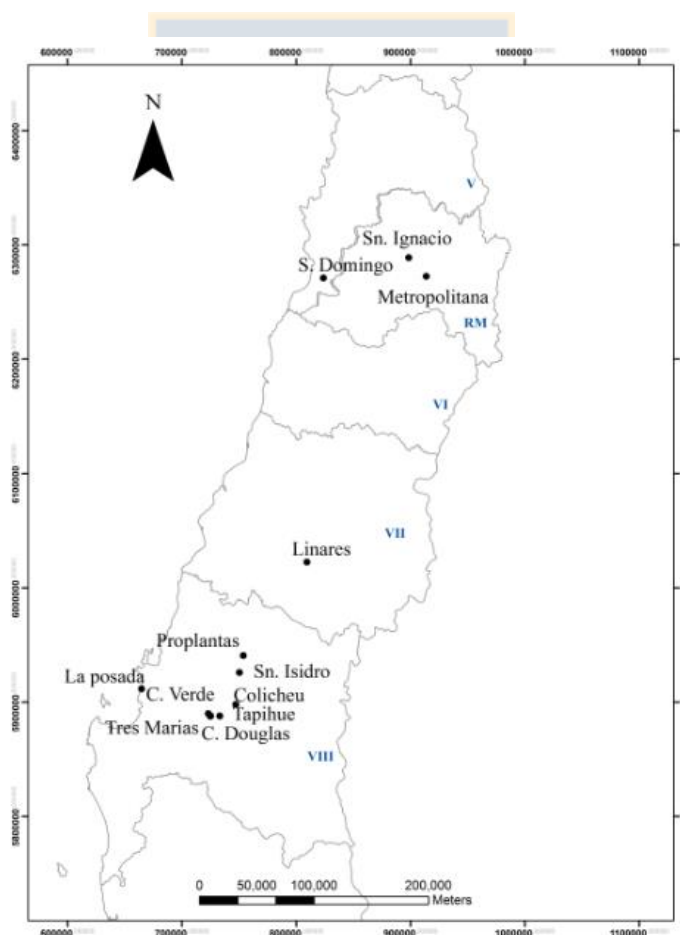


Figura 2. Localización geográfica de los aislados de *Macrophomina phaseolina* utilizados en este estudio

En el caso de los viveros forestales las plantas fueron colectadas en sectores donde se han registrado focos de la pudrición carbonosa (Figura 3A). En las plantaciones, el suelo fue colectado próximo a pinos (25 cm) que presentaban síntomas atribuibles a la enfermedad (Figura 3B). Por cada predio se obtuvieron dos muestras compuestas con aproximadamente 3-4 K de suelo arenoso, las cuales fueron almacenadas en el invernadero hasta su posterior utilización. Además, se incluyeron aislados obtenidos desde árboles o plantas de *Eucalyptus* spp., y *P. radiata* proporcionados por el laboratorio de Patología Forestal, junto con tres aislados obtenidos del cultivo de *Fragaria ananassa*. (Frutilla), localizados en la Región de Valparaíso y del Maule.

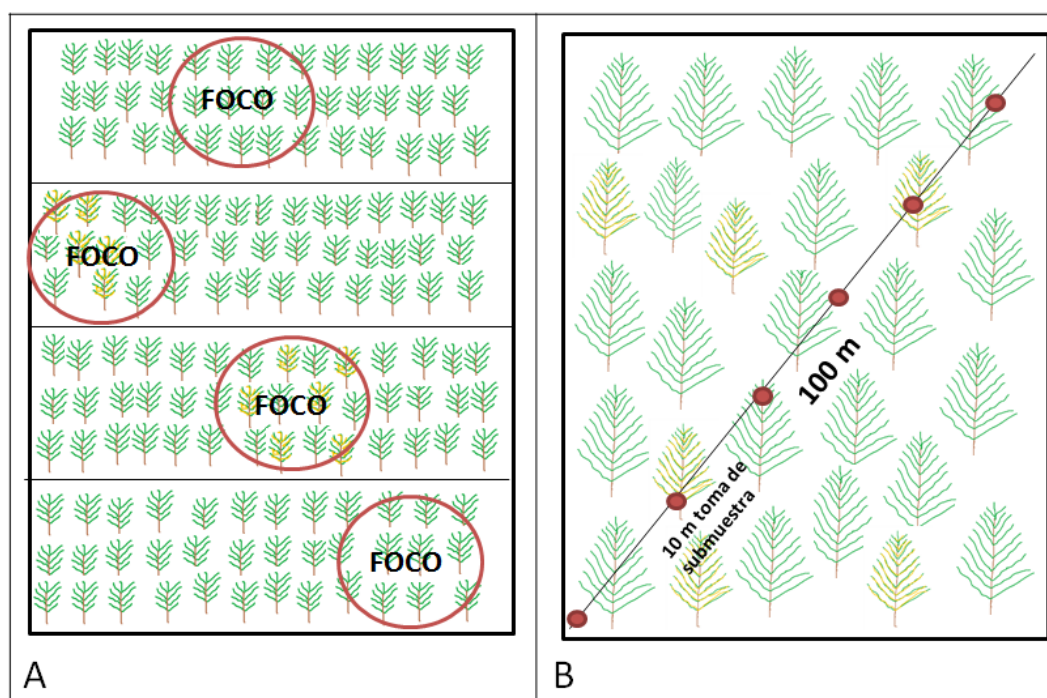


Figura 3. Esquema de la toma de plantas de *P. radiata* en viveros forestales y suelo arenoso en plantaciones. A: registros antiguos de focos de la enfermedad causada por *Macrophomina phaseolina* y B: Diagonal de 100 m en una plantación de *P. radiata*, cada 10 m se tomó una submuestra a 15 cm de profundidad.

Aislamiento de *M. phaseolina* desde plántulas de *P. radiata* y suelo arenoso

Para el aislamiento del hongo se procedió a cortar una sección del tejido enfermo (cuello de la plántula), y lavados con agua potable, desinfectados en etanol al 70% por un minuto y luego en hipoclorito de sodio al 2,5% durante tres minutos. Después de tres lavados sucesivos con agua destilada estéril, el tejido fue secado por diez minutos sobre toallas de papel estériles y fue sembrado en medio de cultivo APD e incubado en una cámara de cultivo por 5 días a 26-28 °C (Gacitúa et al 2009).

Para procesar las muestras de suelo arenoso se procedió a tomar una muestra compuesta de 1000 ml, la cual fue tamizada (1,7 mm) y secada en invernadero. Posteriormente, se tamizó una proporción del suelo a 180 y 44 μm bajo agua potable, fue esterilizado en hipoclorito de sodio al 0,5% por 8 minutos y lavado tres veces con ADE. Se probaron dos metodologías, i) se añadió la porción de suelo en 125 ml de medio selectivo precalentado a 45°C y fue dispensado en placas Petri, ii) el suelo fue resuspendido en ADE, de los cuales 50 μl fueron transferidos al medio selectivo. Ambas muestras fueron incubadas por 7 días a 30°C (Papavizas & Klag 1975). El medio selectivo contiene ADP (39 g/L), Bacto agar (10 g/L), sulfato de estreptomicina (250 μg de ingrediente activo/ml) y Previcur Energy 840 SL 1L Bayer, cuyos ingredientes activos son Propamocarb 53% p/v (530 g/l) y fosetilo 31% (310 g/l) (Mihail & Alcorn 1982). Cabe destacar que para esta actividad, se tuvo un cuidado especial en la selección de colonias individuales de *M. phaseolina*.

Identificación del patógeno: Extracción de ADN y amplificación con partidores específicos

La extracción de ADN fue realizada a partir de micelio crecido en medio BPD por cinco días en agitación (75 rpm) a 28 °C. El micelio fue filtrado a través de papel filtro Whatman N°1, lavado con ADE, secado por 5 minutos. Luego fue liofilizado por dos días. Se utilizaron 20 mg de micelio seco para la extracción de ADN mediante el protocolo DNeasy plant mini kit (Qiagen) con modificaciones tanto en el tiempo de homogenización de la muestra como de la mezcla con el buffer AP2. Para la identificación de los aislados se procedió a amplificar el ADN con primers específicos de *M. phaseolina*, MpkF y MpkR desarrollados en el estudio de Kishore et al. (2007). La PCR se realizó en un volumen total de 20 μl conteniendo Buffer PCR

1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP's 0.1 mM, BSA 8 ug/ml, 0.4 U de Taq Platinum, 0.25 mM de cada partidor MpkF (5'-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3') y MpkR (5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3'), 14 μ l de agua nanopura y 2 μ l del ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto y un ciclo de 72 °C por 10 minutos. El producto de PCR fue visualizado en geles de agarosa al 1.5% usando GelRed para la tinción de las bandas. Se usó marcador de tamaño de 100 pb (NEB). Luego los geles fueron visualizados en transiluminador bajo radiación UV.

Caracterización Fenotípica

- Morfología de los aislados

Para estudiar las características morfológicas de los 44 aislados (triplicado) utilizados en el estudio, se dispuso un disco de micelio proveniente de un cultivo de 5 días en placas petri con medio APD y fueron incubados por tres días a 26°C. Las variables evaluadas para la descripción de la colonia fueron color de micelio, presencia de micelio aéreo, tamaño de los microsclerocios y velocidad de crecimiento de la colonia (Martínez & Laurentin 2012).

- Sensibilidad a clorato

Para la obtención de los fenotipos cloratos (triplicado), se dispuso un disco de micelio proveniente de un cultivo de cinco días en placas de Petri con medio de cultivo que contiene clorato de potasio con algunas modificaciones y fueron incubados a 30°C en oscuridad por dos días. El medio de clorato contiene 20 g agar, 1,6 g de asparagina, 15 g de clorato de potasio, 30 g de sacarosa, 2 g de $NaNO_3$, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y el volumen final de la reacción es ajustado a 1000 ml con H_2O y 0,2 ml de soluciones de oligomentos (95 ml de agua destilada, 10 g de ácido cítrico, 10 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g $Fe (NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$, 100 mg H_3BO_3 , 100 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y 1 ml de cloroformo. El pH del medio fue ajustado a 6,5 antes de ser autoclavado. Para esta variable, se

evaluó el patrón y la velocidad de crecimiento de la colonia por triplicado (Rayatpanah y Alireza 2012).

Variabilidad genética de aislados de *M. phaseolina*

- Análisis AFLPs

Se determinó la variabilidad genética presente en 46 aislados de *M. phaseolina*, utilizando marcadores AFLP mediante el protocolo descrito por Hasbún et al. (2011). Se evaluaron cuatro combinaciones de partidores selectivos Eco+2 y Mse+2, de los cuales se seleccionaron las combinaciones Eco+CC/Mse+CA y Eco+GC/Mse+AG. Los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa al 1%, para verificar el buen funcionamiento del proceso, reflejándose en la amplificación de bandas diferenciales. Posteriormente, fueron sometidos a análisis de fragmentos en el secuenciador AB3100. Los electroferogramas fueron visualizados en el software GeneMapper® (Applied Biosystem). El Bin set fue creado manualmente asignando la presencia de los alelos como 1 y la ausencia 0, generando de esta forma la matriz de datos binaria (Anexo I).

- Estructura genética y Diversidad genética intraespecífica e interpoblacional

Para determinar la estructura poblacional de *M. phaseolina*, se utilizó el análisis bayesiano mediante el software STRUCTURE. La diversidad genética intraespecífica e interpoblacional fue analizada mediante las herramientas informáticas de GenAlex. A partir de la frecuencia de datos binarios se estimó el Número promedio de alelos diferentes (N_a) [1 a 2], Número de alelos efectivos (N_e) [0 a 2], Índice de información de Shannon (I) [0 a 0,5], Índice promedio de diversidad genética de Nei (H_e) [0 a 0,5] y el Porcentaje de loci polimórficos (%P) [0 a 100]. Para el análisis de la diversidad genética interpoblacional se generó la matriz de distancia genética, con la cual se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) y Análisis de Coordenadas Principales (PCA). Se utilizó el análisis BayeScan 2.1 para detectar marcadores bajo selección, el cual resulta ser más eficiente que los métodos clásicos para detectar outliers. BayeScan asume que la frecuencia de los alelos dentro de las poblaciones

siguen una distribución multinomial-Dirichlet con parámetros de F_{st} en función de los componentes específicos de la población compartida entre todos los loci y de componentes específicos de locus compartidos entre todas las poblaciones. Se calcularon las probabilidades posteriores (PO), la cual mide cuanto más probable es el modelo con la selección comparado con el modelo sin selección. Se utilizó un umbral de $P_{0.10}$ para considerar que marcadores se encuentran bajo selección putativo y una tasa de falso descubrimiento (FDR) equivalente a 0,55.

Evaluación de agresividad de aislados de *M. phaseolina* en *P. radiata*

El estudio se llevó a cabo en el invernadero perteneciente a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción. Fue empleado un suelo de textura arenosa colectado entre 0-20 cm de profundidad, desde el vivero forestal La Posada, camino a Coronel, Concepción. La arena fue tamizada a 1,7 mm, esterilizada en autoclave por 20 min a 120 °C y depositada en macetas de 1650 cm³ de capacidad. Para evaluar la agresividad de *M. phaseolina*, se seleccionaron 15 aislados en base al tipo de hospedero y localidad, en donde cada aislado correspondió a un tratamiento.

- Producción de inóculo

Para la producción de inóculo en la forma de esclerocios se procedió a utilizar la metodología descrita en el estudio de Gacitúa et al. (2012). El medio de cultivo líquido utilizado fue BPD (200 g de papa + 20 g de dextrosa/L agua destilada), distribuido en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Posteriormente el medio de cultivo PDB fue autoclavado a 120°C por 20 min. Se adicionaron cuatro discos de micelio de *M. phaseolina*, provenientes de aislados cultivados en medio APD de cuatro días mantenidos a 30°C. Los matraces inoculados fueron mantenidos a 30°C durante un mes en oscuridad. Posterior a ello, el inóculo fue filtrado, secado, molido suavemente utilizando mortero y tamizado simultáneamente a 180 y 45 µm para eliminar restos de micelio. El número de esclerocios por unidad de peso fue determinado con lupa estereoscópica durante dos días. Para determinar la viabilidad del inóculo se realizaron 5 repeticiones por cada aislado y se evaluó la germinación de 10 microesclerocios a las 24 y 48 horas.

- Inoculación

En la parte inferior de cada maceta se adicionaron 400 ml de arena estéril. Luego, el inóculo obtenido de cada aislamiento fue mezclado proporcionalmente con el volumen de arena (200 microesclerocios/ml de suelo) en un fondo plástico durante 3 min a mano y dos min en agitación, y se adicionó una capa de suelo arenoso estéril para la siembra (sin patógeno).

- Siembra de *P. radiata* y condiciones del ensayo

Las semillas de *P. radiata* proporcionadas por el vivero Carlos Douglas, fueron mantenidas en agua por 48 horas antes de la siembra. Por cada repetición se sembraron 20 semillas en cada macetero a 0,5 cm de profundidad y se mantuvieron en el invernadero hasta su germinación. Durante este periodo, el riego fue proporcionado diariamente durante la mañana, tarde y tarde-noche hasta llegar al 100% capacidad de campo, de la misma forma se hizo un registro de la temperatura del suelo.

Las plántulas de pino fueron mantenidas en el invernadero hasta junio de 2014 (141 días), bajo riego esporádico y a temperatura ambiente. Se calculó el porcentaje de humedad del suelo (por triplicado) en cuatro regímenes de riego (día por medio, cada dos días, cuatro y siete días), escogiendo un macetero al azar. La temperatura del suelo fue registrada diariamente durante la mañana, tarde y tarde-noche.

- Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad

Para evaluar la incidencia de la enfermedad (% de mortalidad), se colectaron las plántulas con síntomas de marchitez, amarillamiento y necrosis en el follaje y se observaron con lupa estereoscópica (x25) para determinar la presencia de microesclerocios a nivel del cuello y raíces. La severidad de la enfermedad en plantas asintomáticas fue determinada mediante la toma al azar de seis plantas por cada tratamiento, se sembraron seis segmentos de raíces en placas con medio ADP por duplicado y fueron incubados por tres días a 30°C.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la caracterización morfológica y ensayo de agresividad fueron sometidas al análisis de varianza (ANOVA) en InfoStat. La diferencia entre medias fue comparada por el test LSD Fisher $p < 0,05$. El diseño experimental fue completamente al azar. La relación entre variables fue mediante un análisis de regresión lineal (r^2) Los gráficos fueron construidos con el software SigmaPlot.



RESULTADOS

La información de los aislados colectados se encuentra detallada en la Tabla 1, en donde además se incluyó el grupo, al cual fueron asignados, en función de la especie y/o procedencia para realizar los análisis posteriores.

Tabla 1. Aislamientos de *M. phaseolina* colectados en viveros y plantaciones de la Región del Biobío.

Código	Especie	Procedencia	Tejido	Grupo
01_E_L	<i>Eucalyptus</i> spp.	Linares	raíz	1
02_E_L	<i>Eucalyptus</i> spp.	Linares	raíz	1
03_E_S	<i>Eucalyptus</i> spp.	San Ignacio	raíz	1
04_E_S	<i>Eucalyptus</i> spp.	San Ignacio	raíz	1
05_E_S	<i>Eucalyptus</i> spp.	San Ignacio	raíz	1
06_F_M	<i>F. ananassa</i>	Metropolitana	corona	2
07_Fr_N	<i>K. angustifolia</i>
08_F_SD	<i>F. ananassa.</i>	Sto. Domingo	corona	2
09_F_SD	<i>F. ananassa.</i>	Sto. Domingo	raíz	2
10_N_C	Carlos Douglas
11_N_S	San Ignacio
12_P_A	<i>P. radiata</i>	Posada Arauco	suelo	3
13_P_A	<i>P. radiata</i>	Posada Arauco	suelo	3
14_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
15_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
16_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
17_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
18_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
19_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
20_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
21_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	cuello	3
22_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
23_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
24_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
25_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
26_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
27_P_C	<i>P. radiata</i>	Carlos Douglas	raíz	3
28_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4

29_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4
30_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4
31_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4
32_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4
33_P_F	<i>P. radiata</i>	C. verde F.M	cuello	4
34_P_F	<i>P. radiata</i>	Tapihue F.M	suelo	4
35_P_F	<i>P. radiata</i>	Tapihue F.M	suelo	4
36_P_F	<i>P. radiata</i>	Tapihue F.M	suelo	4
37_P_F	<i>P. radiata</i>	Tapihue F.M	suelo	4
38_P_F	<i>P. radiata</i>	C. Verde F.M	suelo	4
39_P_F	<i>P. radiata</i>	C. Verde F.M	suelo	4
40_P_I	<i>P. radiata</i>	San Isidro	5
41_P_I	<i>P. radiata</i>	San Isidro	5
42_P_I	<i>P. radiata</i>	San Isidro	5
43_P_N	<i>P. radiata</i>	corteza
44_P_P	<i>P. radiata</i>	Proplantas	cuello	6
45_P_P	<i>P. radiata</i>	Proplantas	suelo	6
46_P_P	<i>P. radiata</i>	Proplantas	suelo	6
47_P_P	<i>P. radiata</i>	Proplantas	cuello	6
48_P_P	<i>P. radiata</i>	Proplantas	cuello	6

Identificación de aislados colectados

El ADN proveniente de los 48 aislados de *M. phaseolina* utilizados en el estudio fue amplificado satisfactoriamente con los partidores MpkF y MpkR diseñados por Kishore et al. (2007), obteniéndose el amplicón esperado cercano a los 350 pb, confirmando que todos los aislados corresponden al patógeno *M. phaseolina*. (Figura 4)

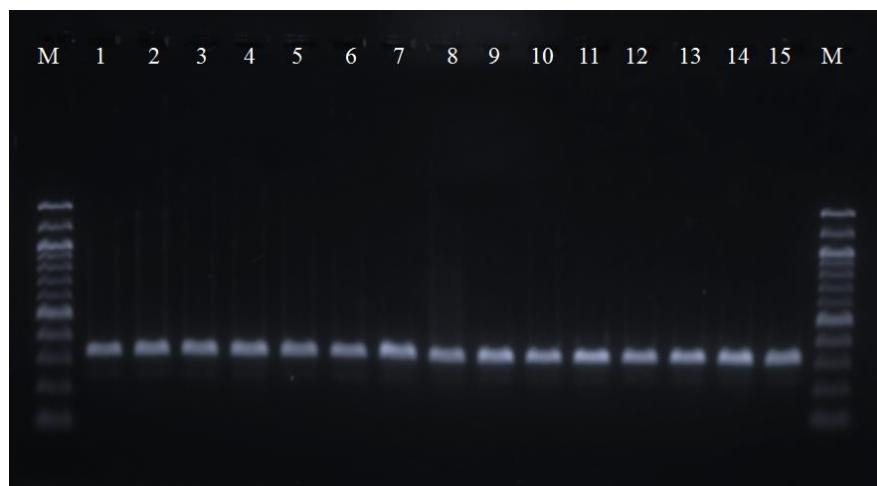


Figura 4. Identificación de aislados de *Macrophomina phaseolina* con los partidores MpKF y MpkR. M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1: aislado de *P. radiata* (43_P_N); 2, 7 y 8: aislado de *P. radiata* vivero Proplantas S.A (44_P_P, 45_P_P y 46_P_P); 3, 4 y 5: aislado de *Eucalyptus* spp. vivero San Ignacio (03_E_S, 04_E_S y 05_E_S); 6: aislado vivero San Ignacio (11_N_S); 9: aislado vivero Carlos Douglas y 14-19: aislado de *P. radiata* vivero Carlos Douglas.

Variabilidad Fenotípica

- Caracterización Morfológica

La morfología de las colonias de los 44 aislados de *M. phaseolina* se encuentra detallada en el Anexo II. Se obtuvieron tres tipos de colonia (morfotipos) para el color del micelio: gris claro, gris y gris oscuro (Figura 5). En la mayoría de los grupos de aislados (3, 4, 5 y 6) están presentes los tres morfotipos (Figura 6). El grupo 1 y 6, correspondientes a aislados de eucalipto y pino del vivero Proplantas, respectivamente, presentan una alta frecuencia de aislados de color gris. Por el contrario se muestra una alta frecuencia de aislados de color gris oscuro en los grupos 3 y 4 formados por aislados de pino del vivero Carlos Douglas y plantaciones de la Forestal Mininco, respectivamente. El grupo 5 contiene aislados del vivero San isidro presentando los tres morfotipos por igual y el grupo 2 con aislados de frutilla presenta una mayor frecuencia de aislados de color gris claro y no presenta morfotipos color gris.

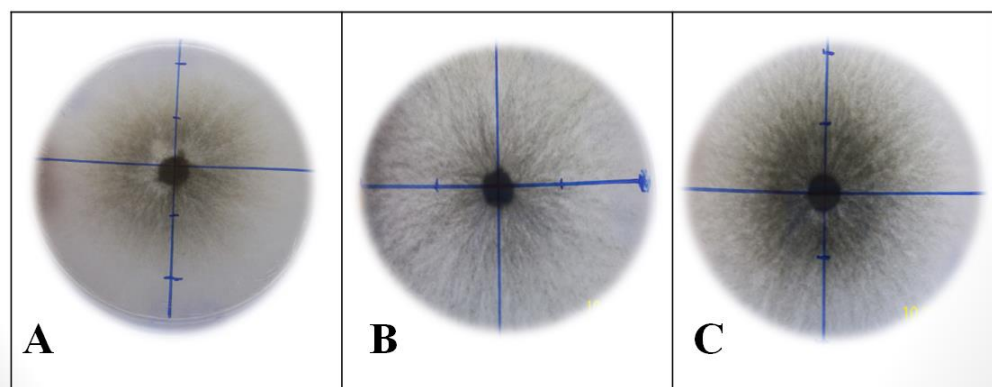


Figura 5. Morfotipos representativos de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecidos en medio APD basados en el color del micelio. A: gris claro; B: gris y C: gris oscuro.

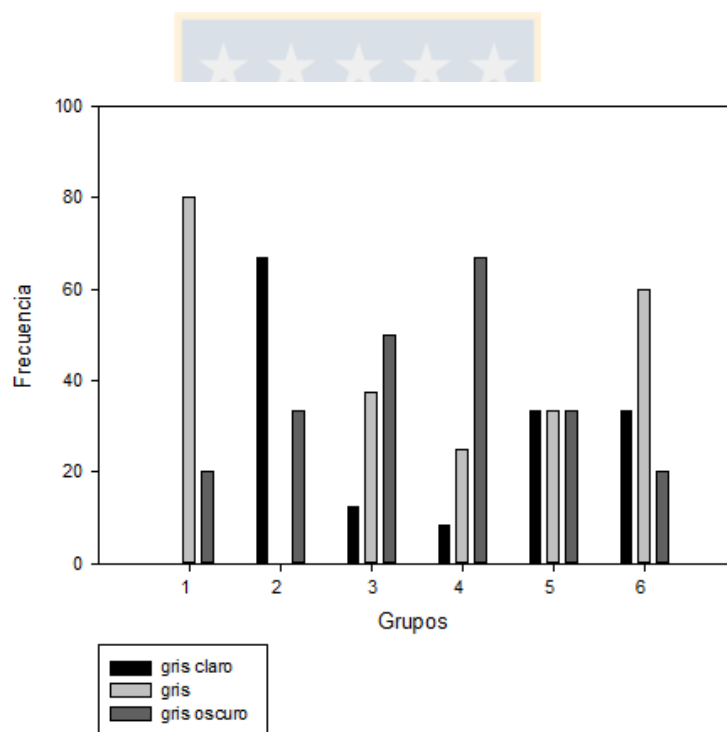


Figura 6. Frecuencia de los tres morfotipos obtenidos a partir del color del micelio de la colonia en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia.

Los aislados presentaron tres patrones de crecimiento del micelio aéreo: escaso, ligero y abundante (Figura 7). Solo los aislados de pino del vivero Carlos Douglas (3) y Proplantas (6) presentaron todos los patrones. Los aislados de frutilla (2) y pino de plantación (4) presentaron una mayor frecuencia del patrón micelio escaso. Los aislados de eucalipto (1) y pino del vivero San Isidro (5) presentaron micelio ligero y abundante. Por un lado, la mayor frecuencia de micelio ligero está en el grupo 1, por el contrario la mayor frecuencia de micelio abundante fue registrada en el grupo 5. Una cierta diferencia fue observada en el patrón de crecimiento del micelio aéreo entre los aislados de pino colectados en el vivero Carlos Douglas y los de plantaciones de la Forestal Mininco.

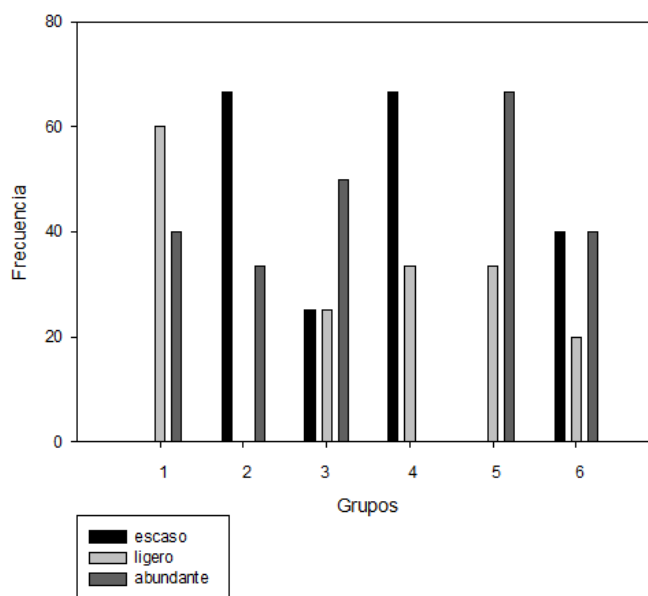


Figura 7. Frecuencia de los tres patrones generados por el crecimiento del micelio aéreo en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia.

Se observaron diferencias significativas en base a la velocidad de la colonia entre los grupos de aislados de *M. phaseolina* (Figura 8). Los aislados de *M. phaseolina* pertenecientes al grupo 1 y 5 presentan una velocidad de crecimiento mayor que el resto. Los grupos 1 y 6 muestran una mayor dispersión o variabilidad de los datos, en cambio los grupos 4 y 5 tienen

una menor dispersión. Los aislados de pino del vivero Carlos Douglas y pino de plantación presentan velocidades de crecimiento similares.

No se observaron diferencias significativas ($p= 0,57$) en el tamaño de los microesclerocios (Figura 9). La media de los grupos 1, 2, 3, 4 y 6 fue cercana a $60 \mu\text{m}$, en cambio para los aislados de pino del vivero San isidro fue de $56 \mu\text{m}$.

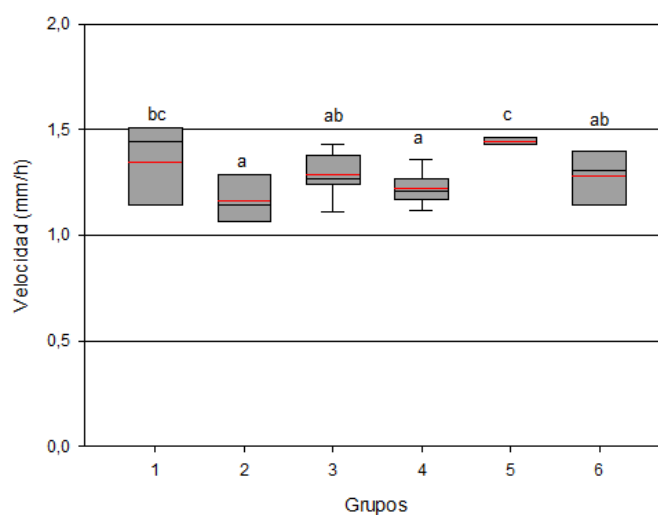


Figura 8. Velocidad de crecimiento de la colonia en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia. Los valores con letras iguales no presentan diferencias significativas ($p>0,05$).

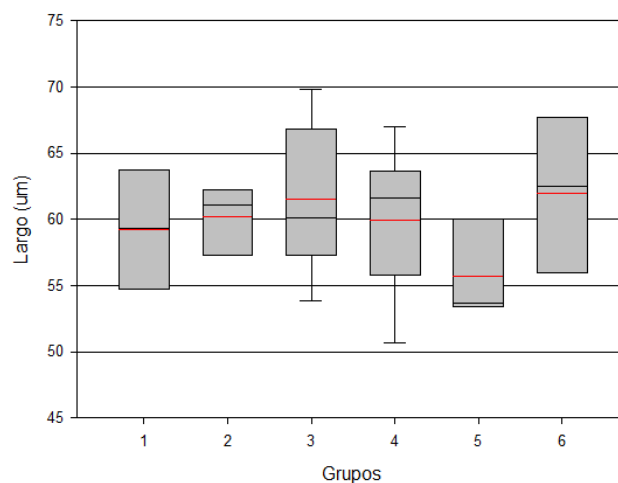


Figura 9. Tamaño de microesclerocios en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia (p-valor ANOVA= 0,57).

- Sensibilidad a clorato

Se observaron tres patrones de crecimiento (restringido/ligero, ligero y abundante) en los aislados de *M. phaseolina* creciendo en medio clorato de potasio (Figura 10). Los aislados que presentaron un patrón de crecimiento denso son considerados resistentes al clorato, mientras que los aislados con crecimiento ligero y restringido son sensibles. Solo los grupos de aislados de eucalipto, pino del vivero Carlos Douglas y San isidro (1, 3 y 5) presentaron aislados sensibles y resistentes al clorato, por el contrario los grupos de aislados de frutilla, pino de plantación y pino del vivero Proplantas (2, 4 y 6) fueron sensibles al clorato (inhibición del crecimiento). Se observó una cierta diferencia en cuanto a la sensibilidad de clorato entre los aislados provenientes del vivero Carlos Douglas y plantaciones de Forestal Mininco (3 y 4) (Figura 11).

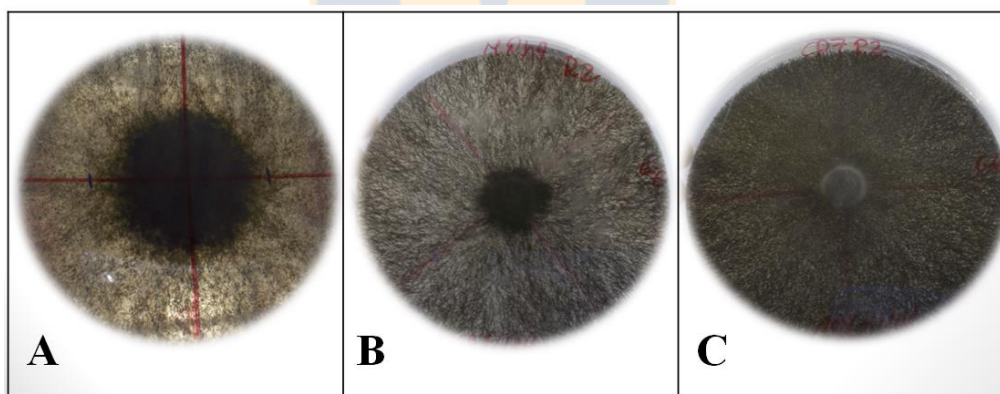


Figura 10. Morfotipos representativos de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecidos en medio que contiene clorato de potasio. A: restringido/ligero; B: ligero y C: denso.

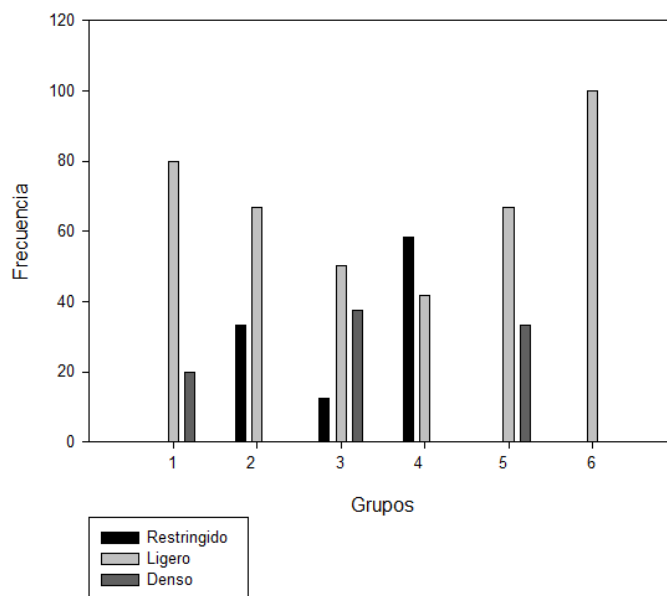


Figura 11. Frecuencia de los tres morfotipos crecidos en medio modificado con clorato en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia

La velocidad de crecimiento de los fenotipos (Figura 12), no presentó diferencias significativas (p -valor= 0,23). Aunque se observó, que los aislados de los grupos 1, 5 y 6 presentaron mayor velocidad que el resto, con una media aproximadamente de 1,7 mm/h y la media del grupo 2 fue la más baja cercana a 1,3 mm/h. Se observó una tendencia similar en la velocidad de crecimiento de los aislados de pino del vivero Carlos Douglas y plantación (3 y 4) en medio de cultivo sin clorato (Figura 8).

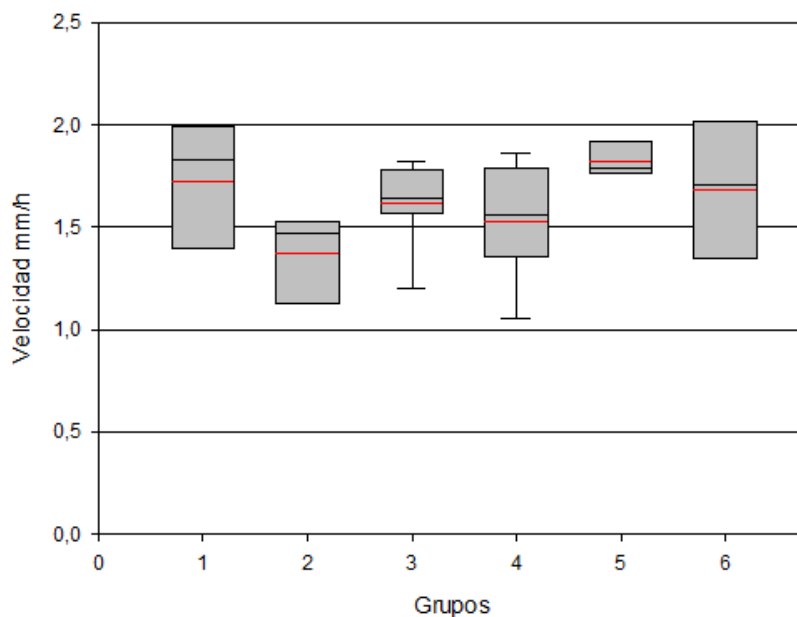


Figura 12. Velocidad de crecimiento de la colonia de los fenotipos clorato en los seis grupos de aislados de *Macrophomina phaseolina* agrupados en función de la especie y/o procedencia (p-valor ANOVA= 0,23).

Relaciones entre variables fenotípicas

En general, no fue posible hacer una correcta relación entre la mayoría de las variables morfológicas evaluadas, ya que los índices de R^2 fueron menores a 0,05 (Anexo III y IV). Aunque, si se muestra una cierta relación entre los fenotipos clorato y patrones de crecimiento del micelio aéreo (Figura 13). Las únicas variables que presentaron un alto índice de R^2 , fueron las velocidades de crecimiento de la colonia y de los fenotipos clorato (Figura 14).

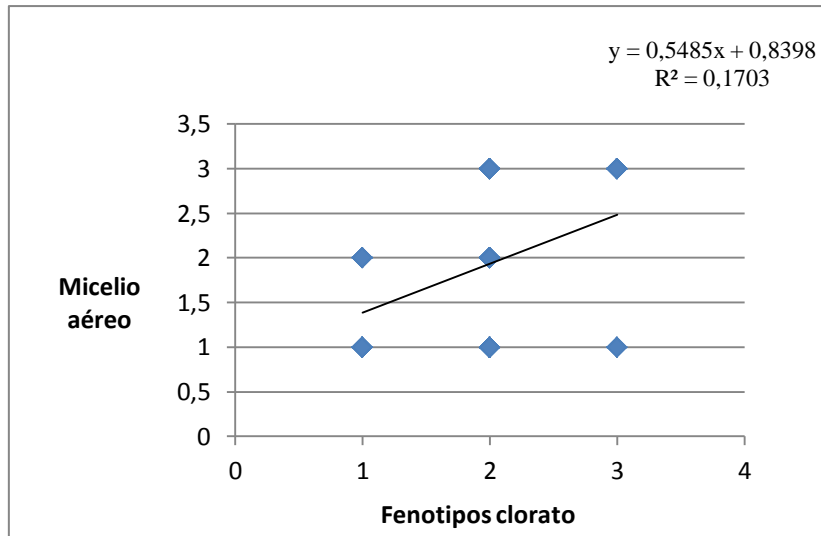


Figura 13. Relación entre variables fenotípicas, patrones de crecimiento del micelio aéreo y morfotipos de aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio de clorato.

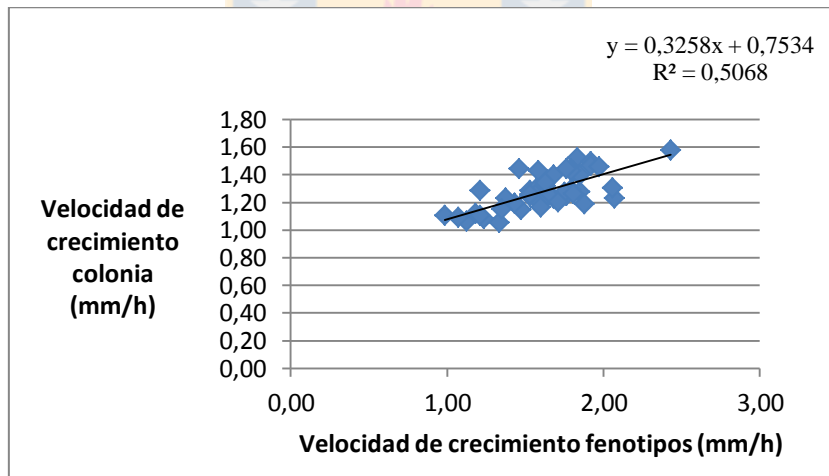


Figura 14. Relación entre variables fenotípicas, velocidad de crecimiento de la colonia y velocidad de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecidos en medio clorato.

Variabilidad genética presente en aislados de *M. phaseolina*

- Estructura genética inferida por agrupamiento bayesiano

El número de grupos genéticos óptimos fue menor al agrupamiento realizado en función de la especie y/o procedencia de los aislados de *M. phaseolina*, lo cual indica un intensivo flujo génico. El máximo $\text{LnP}[D]$ fue $K=4$, el cual se comparó con el delta K (método de Evanno) obteniendo un $K=2$ o $K=4$ (Figura 15). El análisis de Structure confirmó el K óptimo en donde se observaron dos grupos genéticos y detección de la distribución de grupos con un K igual a 3, lo cual podría inferir la existencia de sub-estructuración (Figura 16). Se determinó una diferencia genética entre los aislados provenientes del vivero Carlos Douglas (grupo 3) y los colectados en las plantaciones de Forestal Mininco (grupo 4), esta estructuración se mantuvo estable cuando se analiza un $K=4$. Algunos grupos de aislados mostraron una composición genética hipervariable como el 1, compuesto por aislados de *Eucalyptus*, confirmando de esta forma la presencia de flujo génico.

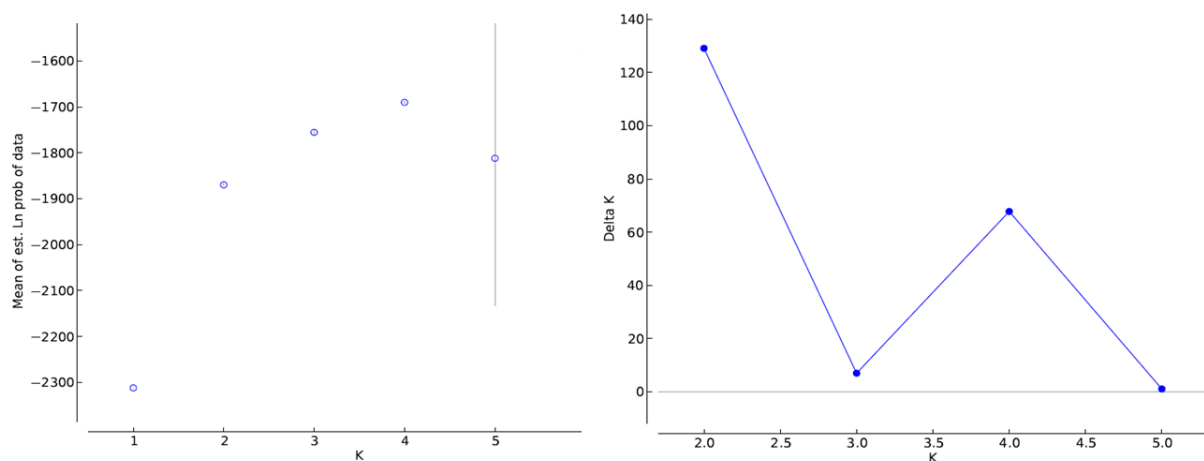


Figura 15. Probabilidad posterior de Log ($\text{LnP}[D]$) y valores del delta K (método de Evanno) contra K (número de grupos poblacionales), obtenido de los datos entregados por Structure y analizados en Structure Harvester.

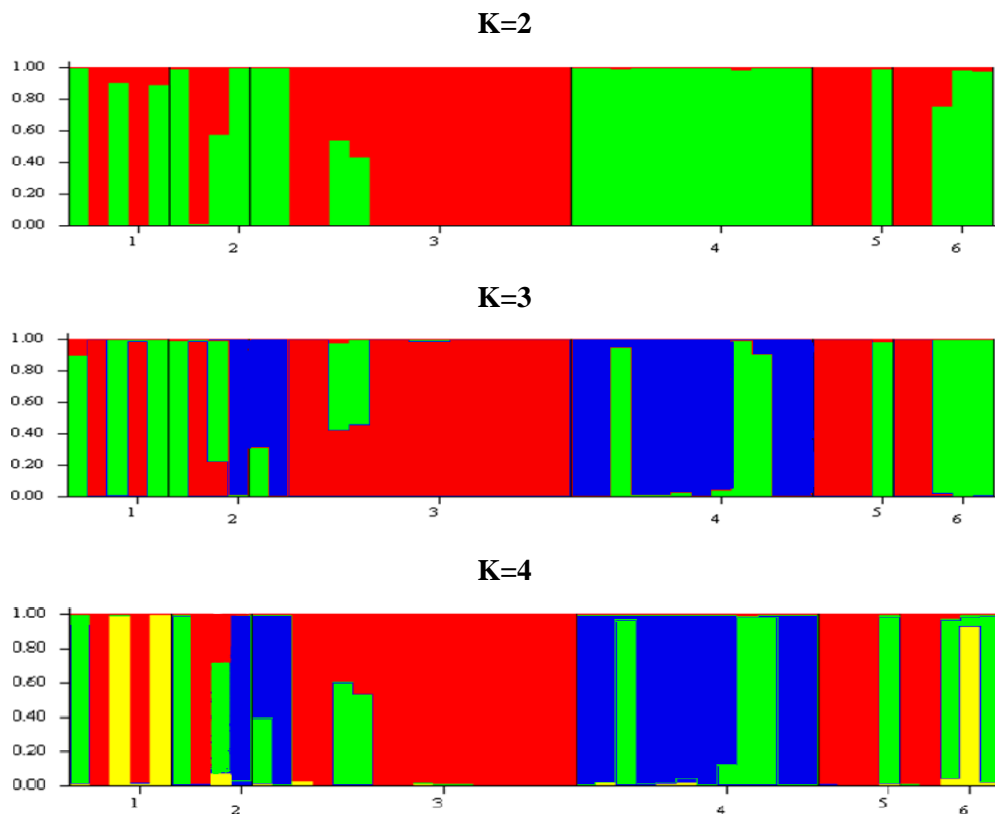


Figura 16. Estimación de subpoblaciones de *Macrophomina phaseolina*. Cada individuo es representado por una barra de colores divididos en K grupos según los cluster encontrados (tres en este estudio). Cada número representa el grupo de aislados en función del hospedero y/o procedencia. Eucalipto (1); frutilla y frangel (2); vivero Carlos Douglas y La Posada (3); plantaciones de pino (4); vivero San Isidro (5) y vivero Proplantas (6).

- Estructura genética inferida por AMOVA y PCA

El análisis de AMOVA concuerda que existen evidencias de diversidad interpoblacional (Figura 17), lo cual se verifica a nivel de poblaciones explicando un 35% de la variación total. El valor de PhiPT (análogo del estadístico Fst) es de 0,349 (p= 0,001).

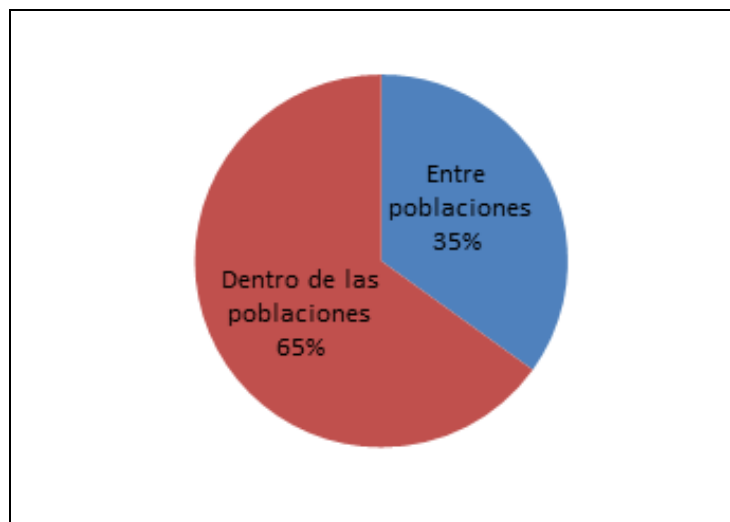


Figura 17. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* de acuerdo al software Structure.

Mediante el análisis de componentes principales (PCA) se determinó que la coordenada N°1 que explica casi un 40% de la variabilidad total, separa a las poblaciones en dos grupos. El 1° grupo (Izquierda) corresponde a la población 1 formada por aislados del vivero Carlos Douglas y el 2° grupo (derecha) estaría compuesto por un subgrupo de la población 1 y 3 (Figura 18). Por otro lado, la coordenada N°2 explica un poco más del 17% de la variabilidad, en donde ciertos individuos pertenecientes a las poblaciones 1 y 3 estarían formando parte de la otra población, indicando la presencia de posible flujo génico. Este resultado confirma que el genotipo de los aislados de *P. radiata* colectados desde el vivero Carlos Douglas, es distinto al genotipo proveniente de las plantaciones forestales.

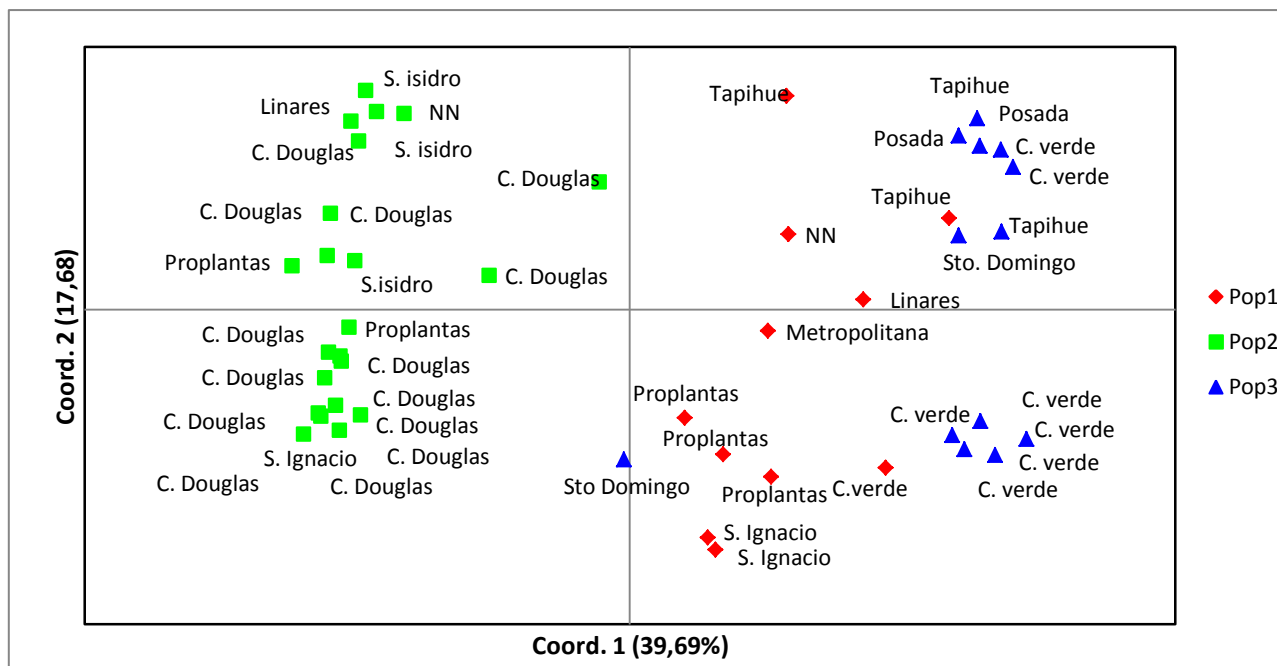


Figura 18. Genotipificación de aislados de *Macrophomina phaseolina* mediante análisis de componentes principales en software Gen Alex.

- Diversidad genética dentro de las poblaciones

La diversidad genética intraespecífica de la especie *M. phaseolina* presente en la región del Biobío, es alta (Tabla 2). En relación a los valores promedios de las tres poblaciones se observó que el índice de Shannon (I) es 0,35, la heterocigocidad esperada (H_e) es mayor a 0,25 y el porcentaje promedio de polimorfismo (%P) superó el 70%. Todos estos índices dan cuenta que la diversidad genética de este fitopatógeno podría considerarse alta.

Tabla 2. Parámetros generales de diversidad genética intraespecífica en *Macrophomina phaseolina* presente en las tres poblaciones generadas por el software Structure.

Población		N	%P	Na	Ne	I	He	μ He
Pop1	Promedio	11	79,41%	1,686	1,502	0,435	0,293	0,322
	D. est.	0	-----	0,065	0,035	0,025	0,018	0,02
Pop2	Promedio	22	65,69%	1,51	1,303	0,293	0,188	0,197
	D. est.	0	-----	0,073	0,033	0,026	0,018	0,019
Pop3	Promedio	13	66,67%	1,51	1,376	0,336	0,222	0,241
	D. est.	0	-----	0,075	0,037	0,027	0,019	0,021
Total	Promedio	15,333	70,59%	1,569	1,394	0,355	0,234	0,253
	D. est.	0,274	4,42%	0,041	0,021	0,015	0,011	0,012

A nivel interpoblacional se observan ciertas diferencias de diversidad genética entre las tres poblaciones (Tabla 2). El índice de la Heterocigocidad esperada insesgada (μ He), señala que la población 1 presenta mayor diversidad genética que las otras. Esta información se respalda con los otros índices como el Número de alelos (Na), Número de alelos efectivamente traspadados a la siguiente generación (Ne) y % P. Las poblaciones 2 y 3 presentan índices y %P similares.

- Análisis de BayeScan 2.1

De los 102 marcadores AFLPs de *M. phaseolina*, cinco fueron los marcadores putativos bajo selección asociados a un FDR= 0,55. Entre estos marcadores, dos 53 y 101 registraron un F_{st} cercano a 0,2 y el resto 16, 57, 87 y 77 presentaron un F_{st} cercano a 0,25 (Figura 19). Las frecuencias alélicas de estos marcadores en las respectivas poblaciones se encuentran detalladas en la Figura 20. La población 2 presentó una alta frecuencia alélica (0,8 a 1) de los marcadores putativos 16, 53, 57, 77 y 101, por el contrario el marcador 87 registró una baja frecuencia, el cual se encontró en las otras dos poblaciones. La población 2, en su mayoría

contiene aislados provenientes desde el vivero Carlos Douglas, por lo que estos marcadores putativos bajo selección estarían presentes solo en estos genotipos.

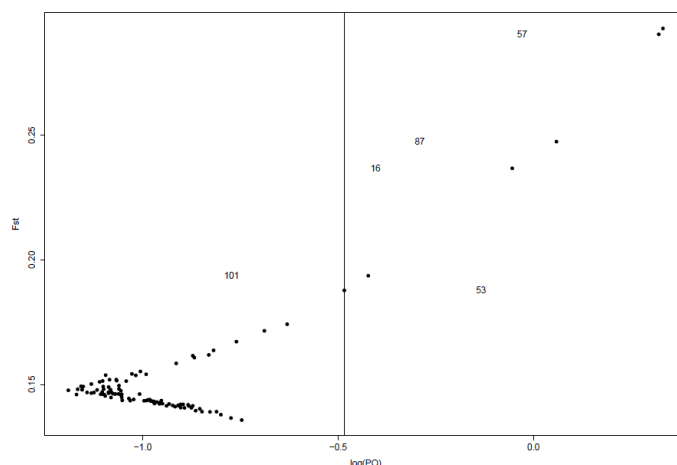


Figura 19. Análisis en BayScan para los 102 marcadores AFLPs provenientes de tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina*. El marcador específico Fst representa frente a las probabilidades posteriores (PO) de estar bajo selección. La línea vertical muestra el PO de 10 utilizada para identificar los marcadores atípicos (outliers)

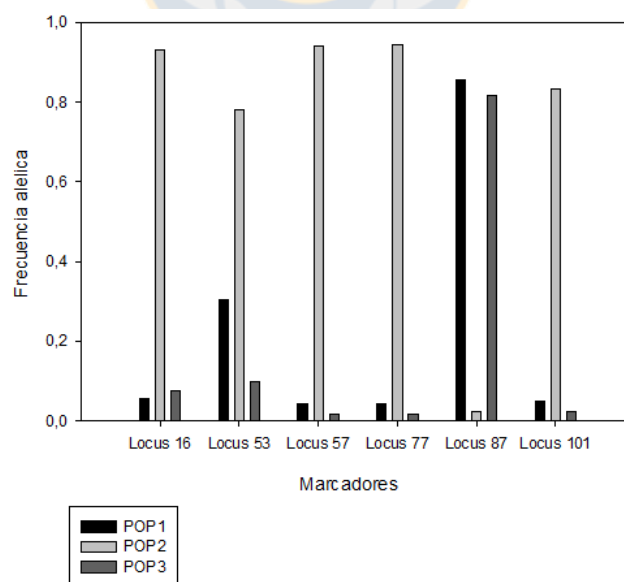


Figura 20. Frecuencia alélica de cada marcador bajo selección putativo presente en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina*.

Asociación entre variabilidad genética y fenotípica en *M. phaseolina*

- Variabilidad genética v/s morfología de la colonia

A partir del $K=3$ entregado por el análisis bayesiano, se procedió a analizar las características morfológicas y fenotípicas presentes en los aislados de *M. phaseolina*. La población 1 está constituida por aislados de *Eucalyptus* spp. (3), *F. ananasa* (1) y *P. radiata* de plantación (3), vivero Proplantas (4), la población 2 por aislados de *Eucalyptus* spp (2), *K. angustifolia* (1) y *P. radiata* de los viveros Proplantas (2), San isidro (3) y Carlos Douglas (14), y la población 3 por aislados de *F. ananasa* (2) y *P. radiata* del vivero La Posada (2) y plantaciones (9).

Las tres poblaciones presentaron todos los morfotipos en distintas frecuencias (Figura 21). Los aislados provenientes de la población 1 y 2 tuvieron frecuencias de morfotipos más parecidos que los de la población 3, lo cual podría ser una característica particular de los aislados provenientes de las plantaciones de pino. Los tres patrones de crecimiento del micelio aéreo, fueron similares entre las poblaciones 1 y 3, en cambio la población 2 presentó un cierto grado de diferenciación (Figura 22).

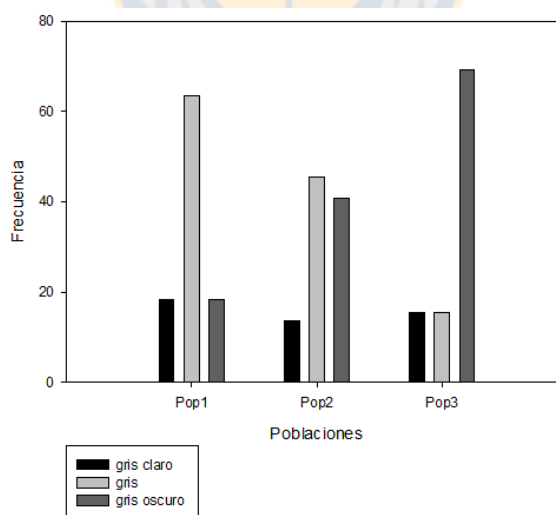


Figura 21. Frecuencia de los tres morfotipos obtenidos a partir del color del micelio de la colonia presente en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* ($K=3$) generado por el software Structure.

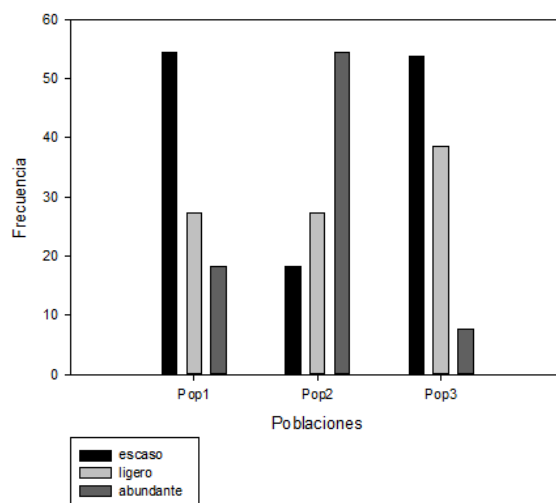


Figura 22. Frecuencia de los tres patrones generados por el crecimiento del micelio aéreo en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* (K=3) generadas por el software Structure.

La velocidad de crecimiento de la colonia y el tamaño de microesclerocios no presentó diferencias significativas en las tres poblaciones genéticas ($p=0,12$ y $p=0,06$, respectivamente). Las poblaciones 2 y 3 muestran un comportamiento similar en la velocidad de la colonia (1,3 mm/h) y tamaño de microesclerocios cercano a 60 μm (Figura 23 y 24).

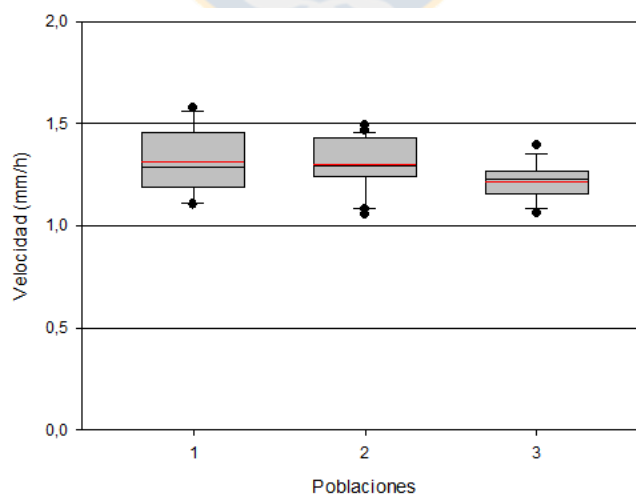


Figura 23. Velocidad de crecimiento de la colonia en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* (K=3) generadas por el software Structure (p -valor Anova= 0,12).

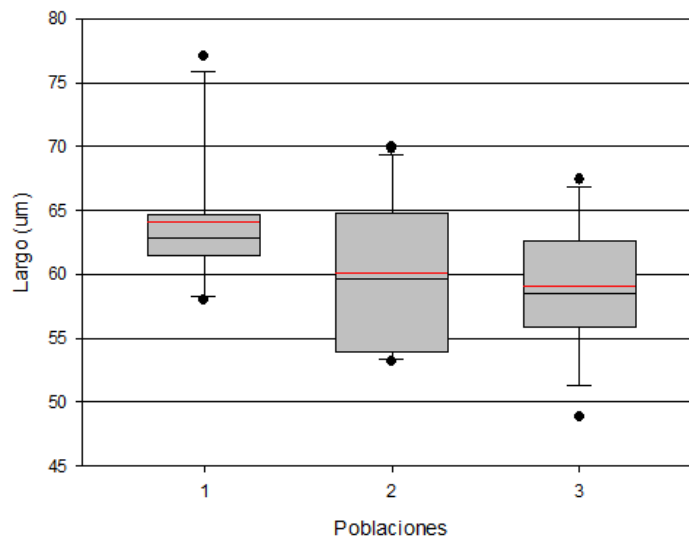


Figura 24. Tamaño de microesclerocios en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* (K=3) generadas por el software Structure (p-valor= 0,06).

- Variabilidad genética v/s sensibilidad a clorato

Los resultados indicaron que en la población 3 tendría 100% de los aislados con alguna sensibilidad al clorato (inhibición del crecimiento), en cambio las poblaciones 1 y 2 presentaron aislados de ambos tipos de sensibilidad al clorato. Solo en la población 1 se detectaron los tres patrones de crecimiento en clorato de potasio (Figura 25). En cuanto a la velocidad de crecimiento de los fenotipos, la población 1, presentó los mayores valores de velocidad, en cambio los aislados de la población 2 y 3 tienen velocidades similares sobre 1,5 mm/h (Figura 26).

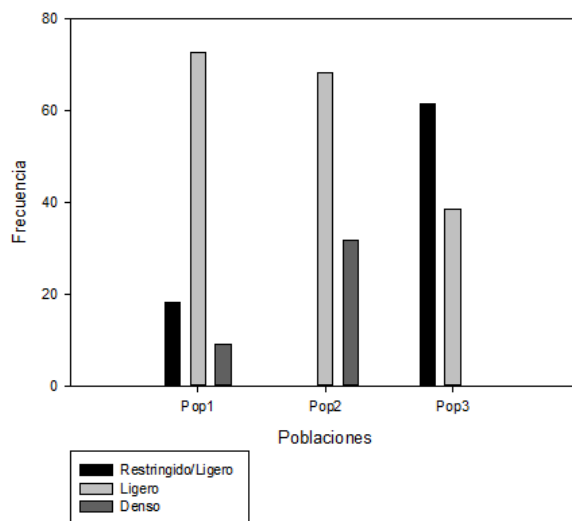


Figura 25. Frecuencia de los tres morfotipos crecidos en medio modificado con clorato en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* (K=3) generadas por el software Structure.

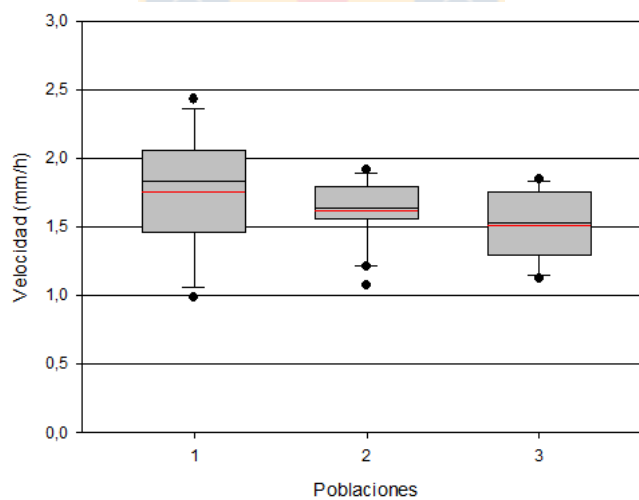


Figura 26. Velocidad de la colonia de los fenotipos clorato en las tres poblaciones de *Macrophomina phaseolina* (K=3) generadas por el software Structure (p-valor ANOVA= 0,13).

Relación entre marcadores putativos bajo selección (medida de variabilidad genética) y variabilidad fenotípica en *M. phaseolina*

Se observó una cierta relación entre los locus 16, 53 y 87 con la variable morfológica del patrón de crecimiento del micelio aéreo de los aislados de *M. phaseolina* (Figura 27 y Anexo X-XI). Los locus 16, 53, 57, 77, 87 y 101 presentaron relación con los fenotipos clorato (Figura 28 y Anexo V-IX), en cambio las variables color de micelio, velocidad de crecimiento de la colonia, velocidad de fenotipos y tamaño de microesclerocios no tienen relación con estos marcadores putativos (Anexo XII-XV).

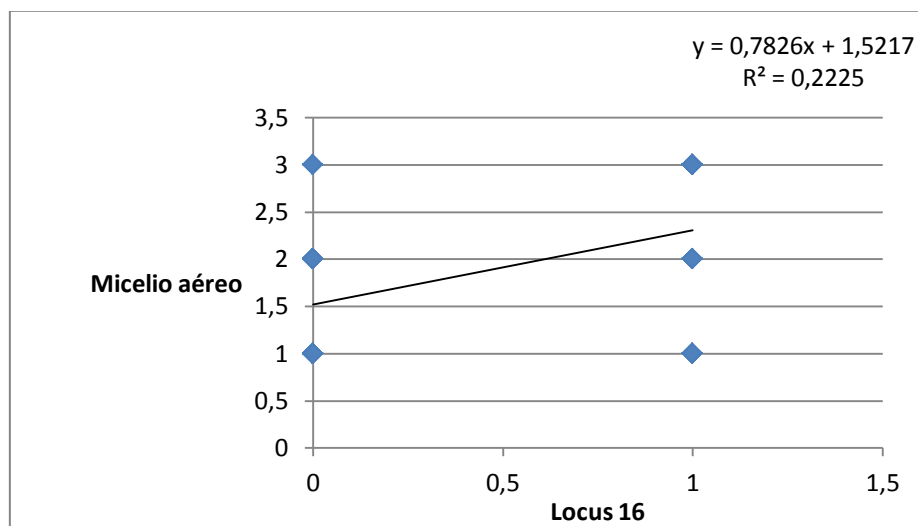


Figura 27. Relación entre el Locus 16 con la variable morfológica del patrón de crecimiento del micelio aéreo presente en aislados de *Macrophomina phaseolina*.

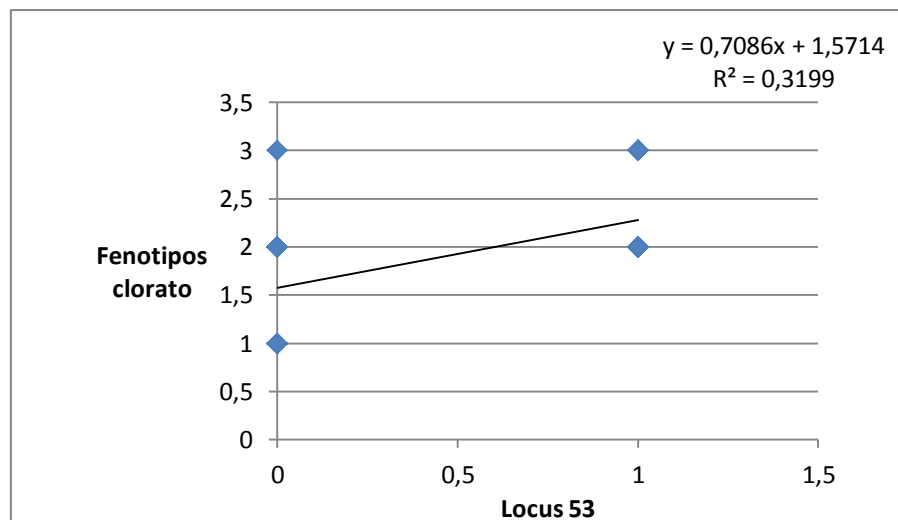


Figura 28. Relación entre el Locus 53 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.

Ensayo de agresividad de *M. phaseolina* en *P. radiata*

- Emergencia de plántulas de *P. radiata*

La emergencia de plántulas en cada tratamiento (réplicas), se detallan en el anexo XVI. El porcentaje de plántulas de *P. radiata* fluctuó entre 60-80% para los tratamientos C2 a C8 y el control (Figura 29). La baja emergencia en los tratamientos C1 y C9-C15, fue atribuido a problemas durante el establecimiento del ensayo, no siendo incluidos en el análisis de los resultados.

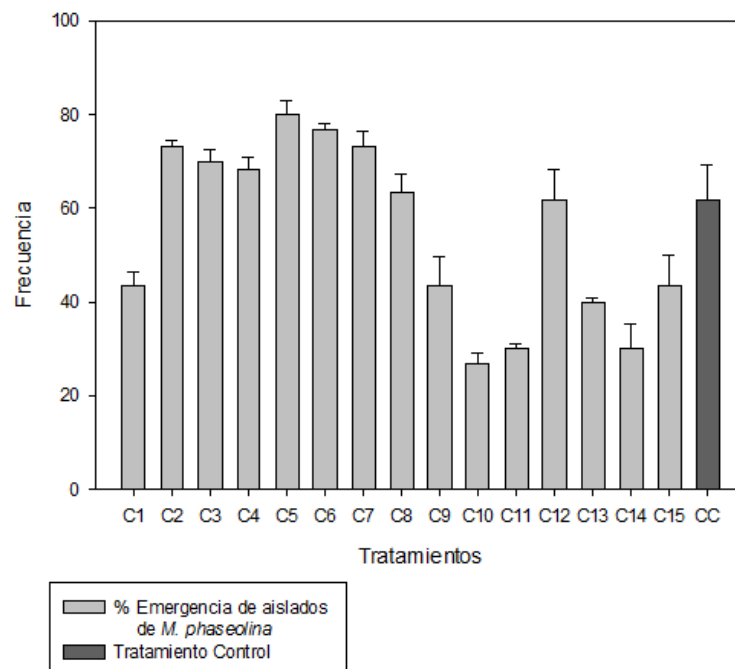


Figura 29. Emergencia de plántulas de *Pinus radiata* en cada tratamiento correspondientes a aislados de *Macrophomina phaseolina* y tratamiento control.

- Condiciones de humedad y temperatura del suelo

El % de humedad se mantuvo estable en los distintos regímenes de riego, entre 10 a 13% antes del riego y sobre el 20% después del riego (Figura 30). La máxima temperatura del suelo fue registrada durante la tarde desde la 1^o a la 6^o semana y ésta fue disminuyendo con el transcurso del tiempo hasta llegar a los 15°C (Figura 31). Se podría considerar que la temperatura influyo positivamente en el desarrollo de esta enfermedad, ya que la mortalidad de las plantas ceso cuando las temperaturas empezaron a descender.

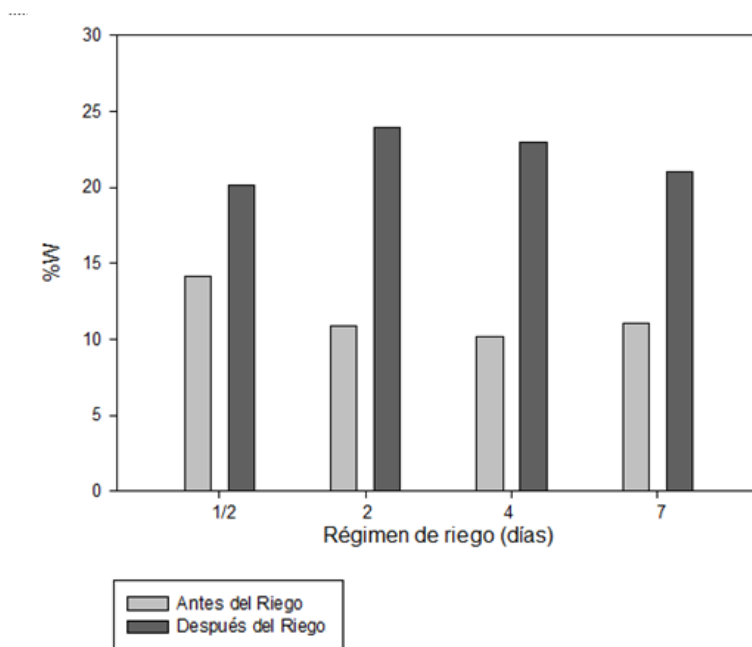


Figura 30. Humedad del suelo tomada antes y después de cada régimen de riego (día por medio, cada dos, cuatro y siete días) durante el transcurso del ensayo de agresividad.

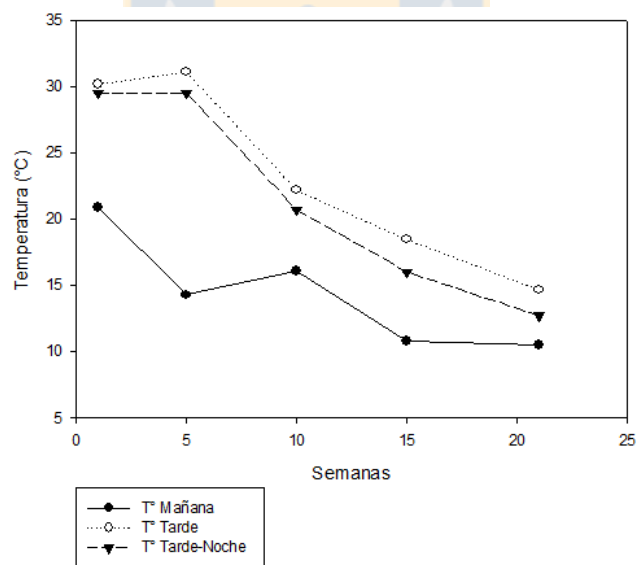


Figura 31. Comportamiento de la Temperatura (°C) semanal del suelo, tomada en tres tiempos: mañana, tarde y tarde-noche durante el transcurso del ensayo de agresividad.

- Mortalidad de plantas de *P. radiata*

La mortalidad se inició a la quinta semana después de la siembra y en algunos tratamientos fue aumentando hasta la semana N°15 (Figura 32). En general, la mortalidad fue relativamente baja, fluctuando entre 30-1,6%, por un aislado de *P. radiata* proveniente del vivero Carlos Douglas (C5). El tratamiento control registro un mortalidad del 1,6%, causada por otros hongos de suelo como *Fusarium* sp. Se observaron diferencias significativas ($p=0,02$) en la mortalidad causada por los distintos aislados, sin embargo no se observa un patrón claro que agrupe a los tratamientos por hospedero o procedencia. La baja mortalidad observada en este ensayo, se debió principalmente al factor temperatura

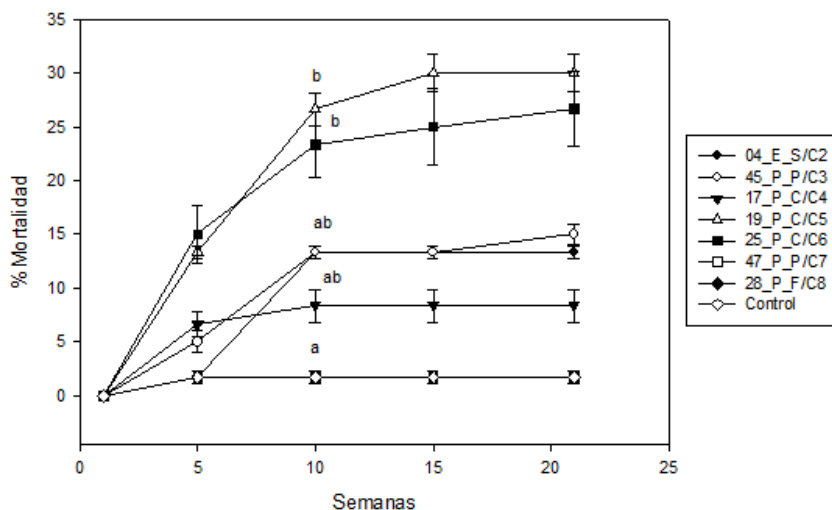


Figura 32. Mortalidad acumulada de plántulas de *Pinus radiata* causada aislados de *Macrophomina phaseolina* (C2 a C8). Letras iguales no difieren significativamente ($p>0,05$).

Se observaron diferencias significativas ($p=0,0147$) en el grado de colonización de raíces de plántulas asintomáticas proveniente de los distintos tratamientos por *M. phaseolina* (Figura 33).

Los tratamientos C2 a C7 superaron el 60% de infección radicular, en cambio el tratamiento C8 correspondiente al único aislado de pino proveniente de plantaciones registro un porcentaje cercano al 45%. Este resultado concuerda con el bajo % de mortalidad registrado por este

tratamiento, el cual fue cercano a 1,6, sin embargo no hay diferencias significativas entre los tratamientos C5 y C6 que causaron un mayor % de mortalidad con respecto a los otros tratamientos. El tratamiento control no presentó ningún grado de colonización por *M. phaseolina*, aunque si de otros hongos y bacterias presentes en el suelo, lo cual se confirma con los resultados obtenidos en el proyecto Innova Biobío 12.253-EM.TES, en el cual se certificó a nivel molecular la ausencia de este patógeno.

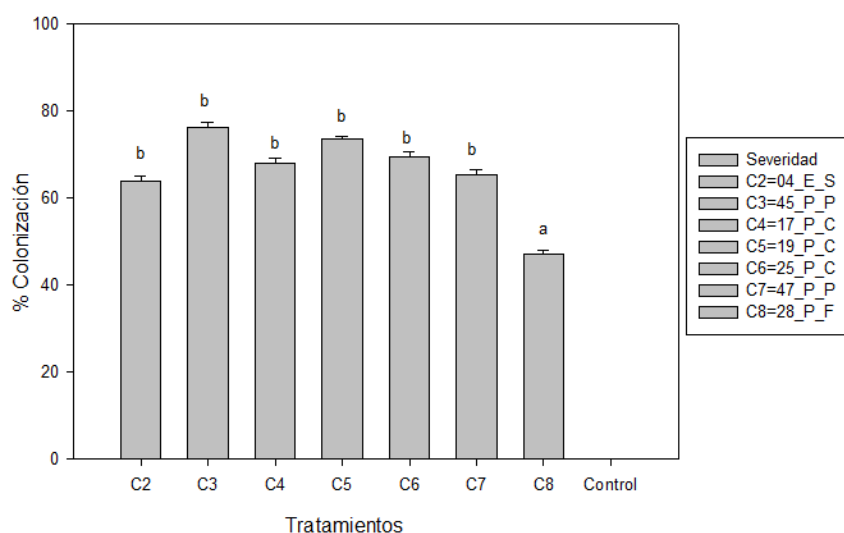


Figura 33. Grado de colonización de raíces de plántulas asintomáticas de *Pinus radiata* causada por aislados de *Macrophomina phaseolina* correspondientes a los tratamientos C2 a C8 más el control del ensayo. Letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En Chile, la enfermedad causada por *M. phaseolina* ocurre con mayor frecuencia en viveros forestales que en las plantaciones. Anteriores reportes han indicado que la presencia de este patógeno en plantaciones, podría deberse al establecimiento de plantas infectadas y asintomáticas que vienen desde el vivero y que luego en condiciones de altas temperaturas y sequía, continuaría el desarrollo de la enfermedad en las plantas. Esta situación es la que se estaba planteando para el problema de *M. phaseolina* en las plantaciones de *P. radiata* en los predios de Forestal Mininco S.A. Sin embargo, en este estudio se muestran diferencias en la caracterización fenotípica y molecular de los distintos aislados colectados en este vivero y en las plantaciones. Tales diferencias podrían atribuirse a las condiciones ambientales que hay en cada uno de ellos. Por un lado, en los viveros forestales existe mayor disponibilidad de agua para las plantas (vía riego), hay aplicación de fertilizantes durante ciertas partes del ciclo del crecimiento y aplicación de fungicidas, los que deben tener diferentes modos de acción (James 2010). En cambio en las plantaciones forestales, durante su etapa inicial que es desde su establecimiento hasta alcanzar una altura de 3 a 4 metros se realiza: control de malezas, fertilización, corrección fustal y exclusión de animales (Sotomayor et al. 2002).

A nivel morfológico, las características cualitativas de los aislados de *M. phaseolina*, colectados en el vivero Carlos Douglas y plantaciones de la Forestal Mininco muestran una cierta diferenciación específicamente en la presencia del micelio aéreo. Por el contrario, las características cuantitativas como velocidad de la colonia y tamaño de microesclerocios nos presentaron mayores diferencias. Resultados similares fueron obtenidos por Bedwell (2005), en el cual se muestran diferencias en el color del micelio y presencia del micelio aéreo entre cepas provenientes del vivero Carlos Douglas y predios forestales de pino y eucalipto. Estas diferencias también han sido constatadas incluso entre cepas del patógeno proveniente de diferentes tejidos de una misma planta (Mihail y Taylor 1995). El tamaño de los microesclerocios de los aislados del vivero y plantación, fue cercano a 60 μm , menor al registrado por Bedwell (2005), quien obtuvo valores entre 122 a 149 μm y de 77 a 100 μm para aislados del vivero Carlos Douglas y plantación de pino/eucalipto, respectivamente. En este caso, los microesclerocios de los aislados de este estudio pertenecerían al grupo C (valores menores de 120 μm), establecido por Dhingra y Sinclair (1978), en el cual solo las

cepas que pertenecen a este grupo tendrían la capacidad de producir picnidios en forma natural. Sin embargo, en nuestro país, no existen reportes de la observación de esta estructura en especies forestales en condiciones de campo. En cuanto a la sensibilidad a clorato, los aislados del vivero Carlos Douglas resultaron ser resistentes y sensibles al clorato, en cambio los aislados de las plantaciones solo fueron sensibles. Estos resultados son similares a los obtenidos por los autores Pearson et al. (1986), Mahdizadeh et al. (2011), Rayatpanah et al. (2012) y Su et al. (2001), los que observaron fenotipos sensibles y resistentes al clorato, la única diferencia estaría en que los aislados de pino no presentaron un crecimiento totalmente restringido, si no que una mezcla entre el patrón restringido y ligero.

El patrón de crecimiento del micelio aéreo mostró una cierta relación con los morfotipos de aislados de *M. phaseolina* crecidos en medio clorato. Además, se evidenció relación entre la velocidad de crecimiento de la colonia con la velocidad de los fenotipos clorato. Este es el primer reporte de la existencia de relación entre las variables fenotípicas de aislados de *M. phaseolina*.

A nivel molecular, los aislados presentan una alta variabilidad y la información de la estructura genética, permitió revelar la existencia de dos grupos, separando a los aislados del vivero Carlos Douglas y plantaciones de la Forestal Mininco. Por lo tanto, este es un primer indicio de que el genotipo de *M. phaseolina*, que se encuentra en la plantación no sería transportado a través de plantas asintomáticas, sino que es propio del lugar. Con esta información no es posible confirmar la existencia de una nueva especie o subespecie de este patógeno, sin embargo ya contamos con la existencia de genotipos distintos en diferentes localidades. Aunque, en el estudio de Sarr et al. (2014) fue reportada una nueva especie de Macrophomina, mediante el análisis de ADN multi-gen para los loci ITS, TEF, ACT, CAL y TUB. De este análisis, resultaron dos grupos bien definidos, uno correspondiente a *M. phaseolina* y el otro a *M. pseudophaseolina*, una nueva especie presente en *Abelmoschus esculentus*, *Arachis hypogaea*, *Hibiscus sabdarifa* y *Vigna unguiculata*. Morfológicamente *M. pseudophaseolina* es similar a *M. phaseolina*, excepto que sus conidias son más cortas. Cabe destacar, que esta nueva especie solo se conoce en Senegal en las especies ya mencionadas. En este estudio no fue posible observar una clara relación entre los grupos genéticos y el hospedero de cada aislamiento, ya que los aislados de frutilla, eucalipto y pino formaron parte

de las tres poblaciones. Sin embargo, si se muestra una diferenciación clara de los grupos genéticos con respecto al origen geográfico de los aislamientos (Vivero Carlos Douglas y plantaciones Forestal Mininco). Son muy pocos los estudios en donde se ha podido observar este tipo relación, Mahdizadeh et al. (2012), encontraron que los aislados pertenecientes a dos localidades tendieron a agruparse en el mismo grupo. Martínez y Laurentin (2012), observaron que los aislados colectados desde el margen izquierdo del río se diferenciaron de los colectados al margen derecho y Mahdizadeh et al. (2011), observaron que usualmente los aislados del mismo hospedero y zona geográfica tienden agruparse cercanamente en el dendograma. Además, cabe considerar que la alta diversidad genética exhibida por los aislados provenientes de especies forestales de la Región del Biobío, podría sugerir que estos aislamientos evolucionaron independientemente y no podrían considerarse de la misma población ancestral, al contrario de lo observado por los autores Almeida et al. (2003), Linhai et al. (2011) y Mahdizadeh et al. (2012) los que revelaron una considerable similitud entre aislados provenientes de distintas zonas geográficas utilizando marcadores RAPD y AFLPs.

Los aislados provenientes de otros hospederos y puntos de colecta presentaron diferencias en las características cualitativas. En cuanto a los parámetros cuantitativos, se observaron diferencias significativas en la velocidad de la colonia de los aislados, agrupando los aislados de frutilla con los de pino de la Forestal Mininco, los del viveros Carlos Douglas con los del vivero Proplantas y los que presentaron las mayores diferencias fueron los aislados de eucalipto con los de pino del vivero San Isidro. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los microesclerocios. Resultados similares fueron obtenidos por Iqbal y Mukhtar (2014), en donde se observaron diferencias significativas en los parámetros morfológicos, sin embargo no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los microesclerocios. En cambio, en el estudio de Linhai et al. (2011), se observaron variaciones en ambos parámetros. A nivel molecular, uno de los grupos genéticos contiene aislados provenientes de varios hospederos (frutilla, eucalipto, pino de viveros y algunos de plantaciones) presentando un alto nivel de polimorfismo. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, en donde aislados de *M. phaseolina* provenientes de diferentes hospederos u origen geográfico exhiben un alto nivel de polimorfismo (Reyes et al. 2006; Beas et al. 2004; Muñoz et al. 2004; Mahdizadeh et al. 2011; Fakrudin y Kuruvinsatti 2007).

En el ensayo de agresividad, los tratamientos presentaron un bajo % de mortalidad, lo cual se debió principalmente al factor de temperatura. Según Hodges (1962) en plántulas de pino, existe una correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y los incrementos de la temperatura del suelo dentro del rango de 21°C a 38°C, observaciones realizadas a nivel de campo indican que esta enfermedad es más severa durante el verano cuando aumenta la temperatura del suelo. Por lo tanto, estos resultados hubiesen sido más satisfactorios si es que hubiésemos contado con una cámara de crecimiento, en la cual se habría controlado este factor. En el estudio de Bedwell (2005), también se registró un bajo % de mortalidad en plantas de *P. radiata* de un año de edad, sin embargo las cepas provenientes de plantaciones de pino registraron 100% de mortalidad, en cambio en nuestro estudio se podría inferir que los aislados que causaron los más altos % de mortalidad provienen del vivero Carlos Douglas. Estos aislados, además, presentan una amplia variabilidad en base a la sensibilidad a clorato, justamente los aislados que registraron los más altos % de mortalidad, presentaron un patrón de crecimiento ligero, por lo que fueron considerados sensibles al clorato. Los aislados sensibles al clorato, en general muestran una tendencia de causar más enfermedad que los resistentes. Una de las razones puede ser la habilidad de los aislados sensibles para utilizar el nitrato, además de otros componentes nitrogenados en las plantas (Dhingra and Sinclair 1978). Estos resultados se podrían asemejar a los obtenidos por Das et al. (2008), en donde también se observa una cierta relación entre la sensibilidad a clorato de aislados de *M. phaseolina* y la severidad de la enfermedad en sorgo. El aislado de pino de plantación presentó bajo % de mortalidad y colonización de raíces en plántulas de *P. radiata*, lo cual nos da un indicio que *M. phaseolina* tendría algún tipo de adaptación al hospedero, tal como ha sido planteado en otros estudios.

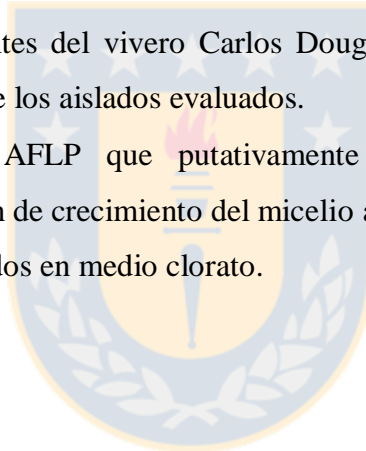
No es posible asociar los marcadores AFLPs con los parámetros morfológicos. En el caso del micelio aéreo, el genotipo de los aislados del vivero Carlos Douglas presentó patrones de crecimientos distintos a los de las plantaciones, sin embargo ambos presentaron similitud en la velocidad de la colonia y tamaños de microesclerocios. Aunque si se observó una asociación entre los grupos genéticos y la sensibilidad a clorato, ya que el genotipo de los aislados de las plantaciones solo presenta aislados sensibles al clorato, en cambio el del vivero Carlos Douglas presenta aislados sensibles y resistentes. Existe evidencia de este tipo de relación entre la sensibilidad y los grupos genéticos, el autor Das et al. (2008), observó que

los aislados sensibles al clorato fueron colocados en dos grupos vecinos en cambio los resistentes fueron dispersados en diferentes grupos en el dendograma. Al relacionar los marcadores putativos bajo selección con las variables fenotípicas, se obtienen resultados similares. Se observó relación entre marcadores solo con las variables: patrón de crecimiento del micelio aéreo y fenotipos cloratos. Por lo tanto se puede decir que en nuestro estudio se observó una relación entre los grupos genéticos con la variabilidad fenotípica de los aislados colectados, lo cual no ha podido ser reportado en otros estudios (Prasad et al. 2011, Martinez y Laurentin 2012, Linhai et al. 2011). En el caso de la variabilidad patogénica no es posible hacer una relación con los grupos genéticos, ya que los aislados utilizados en el ensayo solo forman parte de un grupo genético. Aunque, podemos decir que el genotipo de estos aislados presentan una amplia variabilidad patogénica.

Cabe señalar, que éste es el primer trabajo que se realiza en el área forestal, ya que la mayoría ha determinado la variabilidad presente en aislados de *M. phaseolina* proveniente de especies agrícolas. Además, de ser el primer reporte en nuestro país que da a conocer la variabilidad genética presente en este patógeno fúngico, ya que a la fecha solo se ha realizado estudios de la caracterización morfológica, patogénica y control de tipo físico y biológico (Hinojosa 1997, Bedwell 2005, Gacitúa et al. 2009, Gacitúa et. al 2010, Gacitúa et al. 2012). Por lo tanto, se espera que esta información pueda ser validada con otros estudios a nivel molecular y sea fuente de futuros trabajos que permitan contribuir con estudios de resistencia y control/manejo de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- El patrón de crecimiento del micelio aéreo está relacionado con los morfotipos de aislados de *M. phaseolina* crecidos en medio clorato.
- La velocidad de crecimiento de la colonia de aislados de *M. phaseolina* está relacionada con la velocidad de crecimiento de los fenotipos clorato.
- Las características morfológicas no permiten diferenciar aislados de *M. phaseolina* proveniente de viveros y plantación.
- Los aislados de *M. phaseolina* colectados en el vivero Carlos Douglas y plantaciones de la Forestal Mininco presentaron una alta variabilidad genética y además se diferenciaron genéticamente entre sí.
- Los aislados provenientes del vivero Carlos Douglas se muestran más agresivos en plántulas que el resto de los aislados evaluados.
- Algunos marcadores AFLP que putativamente estarían bajo selección se relacionan con el patrón de crecimiento del micelio aéreo y morfotipos de aislados de *M. phaseolina* crecidos en medio clorato.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aboshosha S., Atta SI., El-Korany AE and El-Argawy E. 2007. Characterization of *Macrophomina phaseolina* isolates affecting sunflower growth in El-Behera governorate, Egypt. *International Journal of Agricultura & Biology*, 9(6):807-815
- Almeida AMR., Abdelnoor RV., Arrabal-Arias CA., Calvalho VP., Jacoud-Filho SS., Marín SRR., Benato LC., Pinto MC and Carvalho CGP. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *M. phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatología Brasileira*, 28: 279-285.
- Azofeifa A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del Trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2): 221-242.
- Barnard EL and Gilly SP. 1986. Charcoal root rot of pines. *Plant Pathology Circular* N° 290.
- Beas R., Reyes M., Medina M and Mayek N. 2004. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Aguascalientes: Relación Patogénica y Genética con aislamientos de otras Regiones de México. *Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (2): 172-177.
- Beas R., De Santiago A., Hernández S and Mayek N. 2006. Characterization of Mexican and no-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean sedes and endoglucanase genes. *Journal of plant pathology*, 88(1): 53-60.

- Bedwell C. 2005. Caracterización de cepas de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Colectadas desde viveros y plantaciones forestales. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Depto. Silvicultura, Chile.
- Boulila M and Mahjoub M. 1994. Inventory of olive disease in Tunisia. Bulletin-OEPP, 31, 111-112.
- Braga R., Labrada R., Fornasari L and Fratini N. 2003. Manual para la capacitación de trabajadores de extensión y agricultores: Alternativas al bromuro de metilo para la fumigación de los suelos. FAO. Unidad de energía y ozonización, Programa ambiental de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- Butin H., y Peredo H.L. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del sur con especial referencia a Chile. J. Cramer, Berlin, Alemania. 100 p.
- Civerolo EL., Narang SK., Ross R., Vick KW and Greczy L(eds.). 1993. Alternatives to Methyl Bromide: Assessment of research Needs and Priorities. U.S. Dept. Agric. Proceedings, U.S.D.A. Workshop on Alternatives to Methyl Bromide. Arlington, VA. 85 p.
- Conde C y Saldaña S. 2007. Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos vulnerabilidad y adaptación. Santiago de Chile. Revista Ambiente y Desarrollo, 23(2): 23-30.
- Crous P., Slippers B., Wingfield M., Rheeder J., Marasas W., Philips A., Alves A., Burgerst T., Barber P and Groenewald J. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Studies in Mycology, 55: 235-253.
- Das LR., Fakrudin B and Arora DK. 2008. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. Microbiological Research, 163(2): 215-224

- Dhingra OD y Sinclair JB. 1974. Effect of soil moisture and carbón: nitrogen ratio on the survival of *Macrophomina phaseolina* in soybean stems in soil. Pl.Dis. Repr. 58: 1034-1037
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1978 Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa/MG, Brasil. UFV, Imprensa Universitária.
- Fakrudin R and Kuruvinashetti. 2007. Genetic variability of sorghum charcoal rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) assessed by random DNA markers. The Plant Pathology Journal, 23(2): 45-50.
- Gacitúa S., Valiente C., Díaz P., Hernández J., Uribe M and Sanfuentes E. 2009. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Chilean Journal of Agricultural Research. 69 (4): 526-533.
- Gacitúa S., Rubilar R., Shuijin H., Valdebenito D y Sanfuentes E. 2010. Efecto de enmiendas orgánicas sobre el desarrollo de la pudrición carbonosa de la raíz en *Pinus radiata*. En XIX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología Resúmenes. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Pucón, Chile.
- Gacitúa S., Rubilar R and Sanfuentes E. 2013. Temporal analysis of charcoal root rot in forest nurseries under different pathogen inoculum densities and soil moisture content. Journal Tropical Plant Pathology, 38(3): 179-187.
- Ghoneim SSH., Abdel-Massih MI and Mahmoud FAF. 1996. Interaction between root-knot nematode and root rot on olive trees. Annals of Agri Sci, 41:446-461.
- Ghosh T., Mukherji N and Basak M. 1964. On the occurrence of a new species of *Orbilaria* Fr. Jute Bull, 27: 134-141.
- Gonzales M y Simpson J. 1997. capítulo 1: Diversidad genética en hongos (origen y análisis). Departamento de Ingeniería genética. CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. pp: 4-23
- Hasbún R., Moraga P., Wachtendorff P., Iturra C., Carrasco A., Balocchi C and Valenzuela S. 2011. An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree

- genomes using fluorescent capillary detection. *Tree Genetics & Genomes*, 8(4): 925-931.
- Hinojosa J.C. 1997. Susceptibilidad de algunas especies forestales nativas Chilenas a *Macrophomina phaseolina* (TASSI) GOID. . Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Universidad de concepción. Facultad de Ciencias Forestales. Depto. Silvicultura, Chile.
- Hodges C. 1962. Black root rot of pine seedlings. *Phytopathology*, 52: 210-219.
- INFOR. 2014. Anuario Forestal. Boletín estadístico N°144, 160 pp.
- Iqbal U and Mukhtar T. 2014. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phasoelina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.) wilczek from Pakistan. *The Scientific World Journal*. Artículo ID 950175, pp: 1-9.
- James R. 2010. Management guide for forest nursery diseases. Forest Health Protection and State Forestry Organizations. 18.1, pp: 1-5.
- Kaur S., Singh G., Kaur S., Edward G., Chand R and Bahadur V. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2): 136-151.
- Kaur S., Dhillon G and Chauhan V. 2013. Morphological and pathogenic variability in *Macrophomina phaseolina* isolates of pigeonpea and their relatedness using principle component analysis. *Archives of Phytopathology & Plant protection*. DOI: 10.1080/03235408.2013.792538.
- Kendig S.R., Rupe J.C and Scott H.D. 2000. Effect of irrigation and soil wáter stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. University Arkansas Fayetteville. *Plant Disease*, 84: 895-900.
- Kishore, B. A. Saxena, A. Srivastava y D. Arora. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycología* 99 (6): 797-803.

- Krishnamurthy K.V. 2003. Textbook of Biodiversity. Science Publishers, United States of America. 242 pp.
- Labrada R. 1995. El desarrollo actual de la solarización del suelo. FAO. Taller “Solarización del suelo”. Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano” Honduras.
- La Discusión. 2013. Confirman efectos de cambio climático en Región del Biobío. Citado el 10/05/2015. Disponible en http://www.cambioclimatico Chile.cl/ver_noticia.php?idnoticia=826,
- Linhai W., Yanxin Z., Donghua L., Junbin H., Wenliang W., Haixia L and Xiurong. 2011. Variations in the isolates of *Macrophomina phaseolina* from sesame in China based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pathogenicity. African Journal of Microbiology Research, 5(31): 5584-5590.
- Macias O., Delgado Y., Peña E., León R and Barreto R. 2006. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. Universidad de Matanzas “Camilo Cinfuegos”.
- Martínez-Hilders A y Laurentin H. 2012. Caracterización fenotípica y molecular de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. proveniente de la zona de producción de Ajonjolí en Venezuela. Bioagro, 24(3): 187-196.
- Mahdizadeh V., Safaie N and Mohammadi E. 2011. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. The Plant Pathology Journal, 27(2): 128-137.
- Mahdizadeh V., Safaie N and Goltapeh E. 2012. Genetic diversity of sesame isolates of *Macrophomina phaseolina* using RAPD and ISSR markers. Trakia Journal of Sciences, 10(2): 65-74.
- Maiti S., Hedge MR and Chattopadhyra SB. 1988. Handbook of anual oil seed crops. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing.
- McCain AH and Smith RS. 1972. Quantitative assay of *Macrophomina phaseolina* from soil. Phytopathology, 62: 1098.

- McDonald B. 1997. The population genetics of fungi: Tools and Techniques. Symposium on population genetics of soilborne fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 87(4):448-453
- McDonald B and Linde C. 2002. Pathogen population genetics evolutionary potential and durable resistance. Institute of plant science, Plant Pathology group, Federal Institute of technology. *Annual Review of Phytopathology*, 40:349-379.
- Mihail JD. 1992. *Macrophomina*. Pp 134-136 En: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. Singleton LL, Mihail JD and Rush CM, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Mihail, J. y S. Alcorn. 1982. Quantitative recovery of *Macrophomina phaseolina* sclerotia from soil. *Plant Dis.* 66: 662-663.
- Mihail JD and Taylor SJ. 1995. Interpreting of variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1596-1603.
- Mujica F y Vergara C. 1980. Flora fungosa Chilena. 2° Edición. Revisada y actualizada por Edgar Oehrens Bertossi. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Ciencias Agrícolas N°5, 306 pp.
- Muñoz-Cabañas R., Hernández-Delgado S and Mayek-Pérez N. 2004. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1):11-18.
- Norton D. 1953. Linear growth of *Sclerotium bataticola* through soil. *Phytopathology* 43: 633-636.
- Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez, P. y Marcos, José F. 2007. Herramientas biotecnológicas en fitopatología.

- Papavizas, G.C. & N.G. Klag. 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65(2): 182-187.
- Pearson C., Leslie J and Schwenk F. 1986. Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. *Phytopathology*, 76: 646-649.
- Pérez N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba 296 p.
- Pildain M y Errasti A. 2011. Hongos patógenos de Pinos en la Patagonia y su asociación con plagas entomológicas. Serie técnica: Manejo integrado de plagas forestales. Cuadernillo N°12. INTA
- Piñero, D., et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp: 437-494.
- Prasad R., Navaneetha T and Rao N. 2011. Cultural, morphological, pathogenic and molecular diversity in *Macrophomina phaseolina* isolates of safflower from southern India. *Indian Phytopathology*, 64(3): 247-253.
- Rayatpanah S and Alireza S. 2012. Diversity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid base don chlorate phenotypes and pathogenicity. *International Journal of Biology*, 4(2): 54-63.
- Rivera G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. EUNED, pp: 221-224
- Reuvent R and Madar Z. 1985. The role of *Macrophomina phaseolina* in mortality of pine seedlings in forest nurseries. *Phytopathology*, 112: 161-164
- Reyes M., Hernandez S., Beas R., Medinda M., Simpson J and Mayek N. 2006. Pathogenic and genetic variability whitin *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *Journal Phytopathology*, 154: 447-553.

- Sánchez-Hernández ME., Pérez-de-Algalba A., Blanco-Lopez MA and Trapero-Casas A. 1996. Vascular wilt of Young olive trees. *Agricultura Revista-Agropecuaria*, 65(77): 2928-2932.
- Sarr M., Ndiaye M., Groenewald J and Crous P. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2): 250-268.
- Seymour CP. 1969. Charcoal rot of nursery-grown pines in Florida. *Phytopathology*, 59(1): 89-92
- Seymour CP and Cordell CE. 1979. Control of charcoal root rot with methyl bromide in forest nurseries. *So, Jour, Appl, For*, 3: 104-108.
- Sotomayor A., Helmke E y García E. 2002. Manejo y mantención de plantaciones forestales *Pinus radiata* y *Eucalyptus* sp. Documento de divulgación N°23. pp: 9-12.
- Smith R. 1970. *Tree pathology; a short introduction*. New York, N.Y., Academic Press. 309 p.
- Smith R., Hodges CS and Cordell CE. 1989. Charcoal root rot and black root rot: Forest nursery pest. *Agriculture Handbook 680*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., USA, pp: 112-113
- Su G., Sush S.O., Schneider R.W., and Russin J.S. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*, *Phytopathology* 91: 120-126.
- Valiente C., Díaz K., Gacitúa S and Martínez M. 2008. Control of Charcoal root rot in *Pinus radiata* nurseries with antagonistic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 557-568.

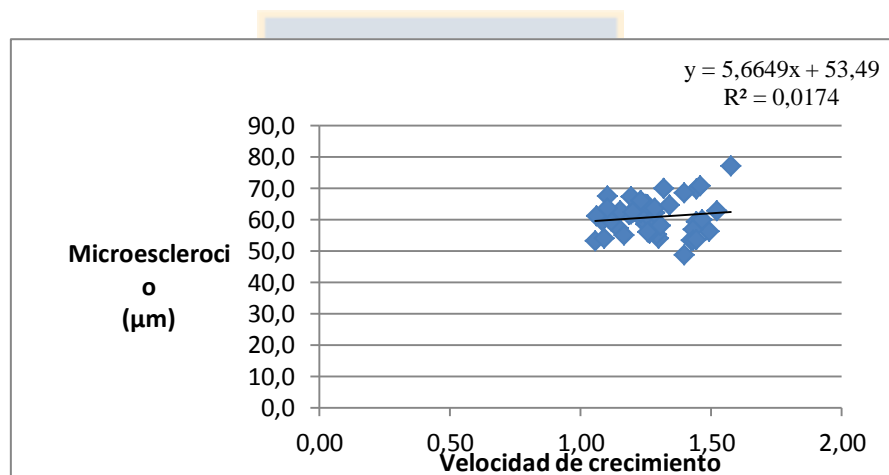
ANEXO

Anexo I. Matriz binaria de 0 y 1 obtenida de los marcadores AFLPs

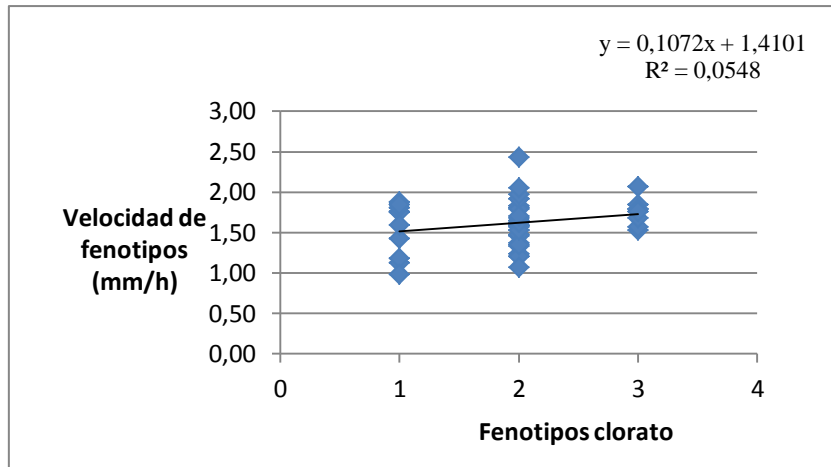
Anexo II. Variaciones morfológicas entre distintos aislados de *M. phaseolina*

Muestra	Código	Veloc. Colonia (mm/h)	Velocidad fenotipos clorato	microesclerocios (largo μm)
1	01_E_L	1,23	2,07	64,7
2	02_E_L	1,06	1,33	53,2
3	03_E_S	1,52	1,83	62,8
4	04_E_S	1,49	1,92	56,2
5	05_E_S	1,44	1,46	59,3
6	06_F_M	1,28	1,53	62,2
8	08_F_SD	1,15	1,47	57,3
9	09_F_SD	1,06	1,13	61,1
12	12_P_A	1,25	1,76	58,5
13	13_P_A	1,12	1,18	59,5
14	14_P_C	1,28	1,85	59,1
15	15_P_C	1,44	1,79	69,8
16	16_P_C	1,30	1,57	54
17	17_P_C	1,29	1,79	55,3
18	18_P_C	1,42	1,81	53,4
19	19_P_C	1,25	1,58	64,9
20	20_P_C	1,43	1,58	56,9
21	21_P_C	1,24	1,53	59,7
22	22_P_C	1,40	1,68	68,5
23	23_P_C	1,10	1,21	67,5
24	24_P_C	1,26	1,57	60,6
25	25_P_C	1,32	1,63	70
26	26_P_C	1,23	1,68	62,1
27	27_P_C	1,26	1,65	64,7
28	28_P_F	1,19	1,60	61,7
29	29_P_F	1,19	1,43	67,4
30	30_P_F	1,19	1,88	61,5
31	31_P_F	1,27	1,75	57,1
32	32_P_F	1,26	1,81	55,7

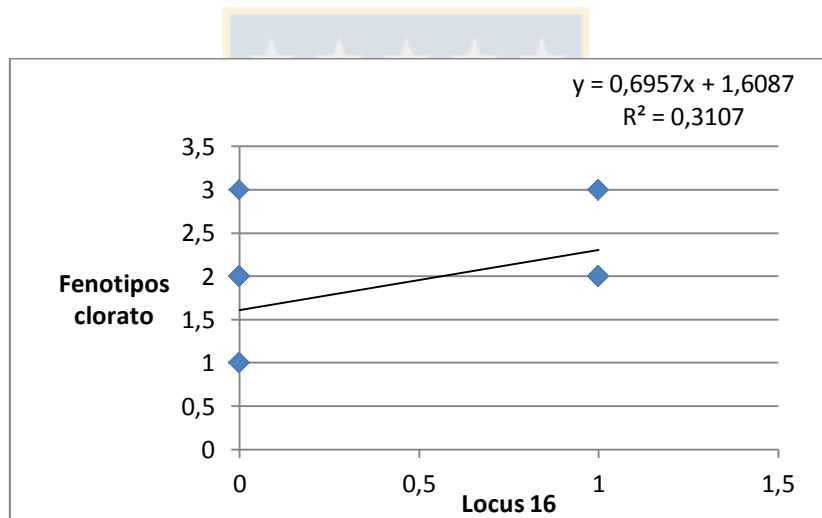
33	33_P_F	1,17	1,60	55
34	34_P_F	1,23	1,38	66
35	35_P_F	1,28	1,21	63,6
36	36_P_F	1,15	1,35	62,8
37	37_P_F	1,10	0,99	63,7
38	38_P_F	1,26	1,53	56
39	39_P_F	1,40	1,85	48,8
40	40_P_I	1,43	1,79	53,4
41	41_P_I	1,47	1,92	60
42	42_P_I	1,44	1,76	53,7
44	44_P_P	1,34	1,63	64,6
45	45_P_P	1,09	1,07	53,9
46	46_P_P	1,46	1,97	70,8
47	47_P_P	1,20	1,71	62,5
48	48_P_P	1,31	2,06	58



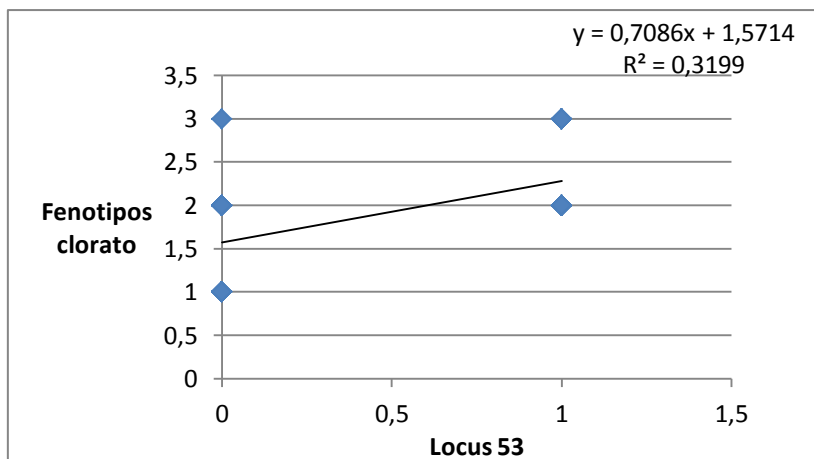
Anexo III. Relación entre las variables morfológicas, tamaño de microesclerocios y velocidad de crecimiento de los aislados de *Macrophomina phaseolina*.



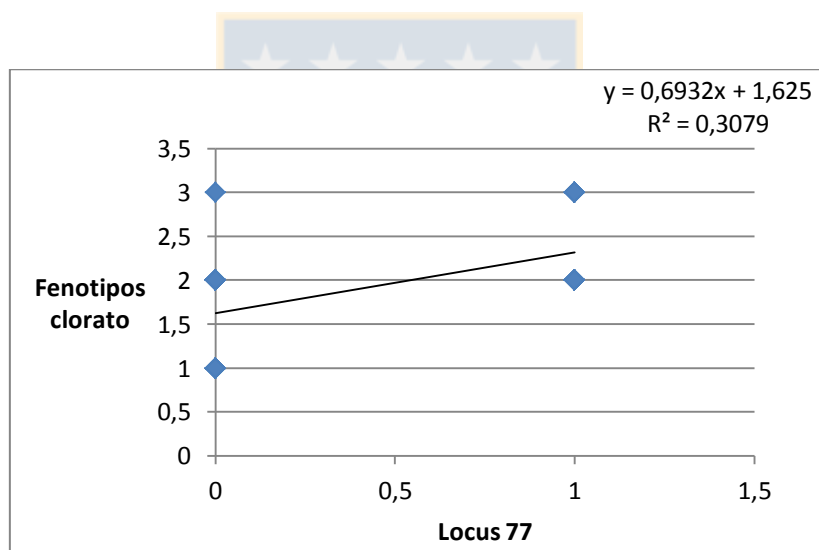
Anexo IV. Relación entre las variables morfológicas, velocidad de crecimiento de los fenotipos clorato y morfotipos de aislados de *Macrophomina phaseolina* crecidos en medio clorato.



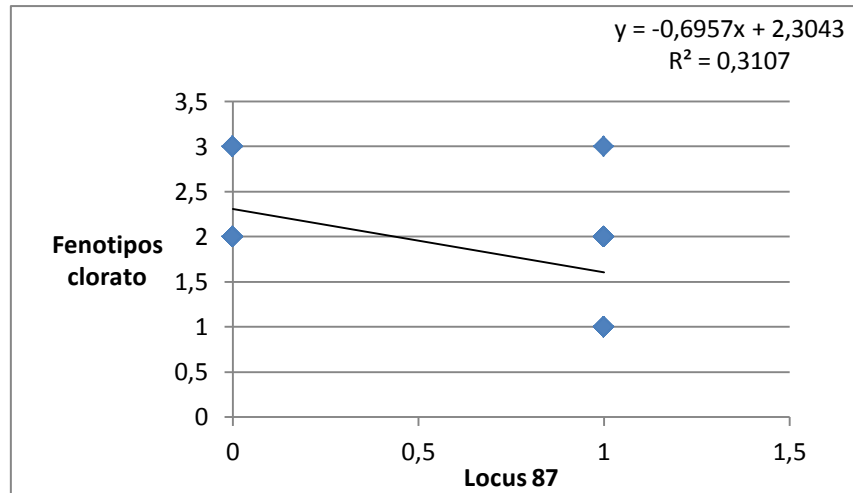
Anexo V. Relación entre el Locus 16 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



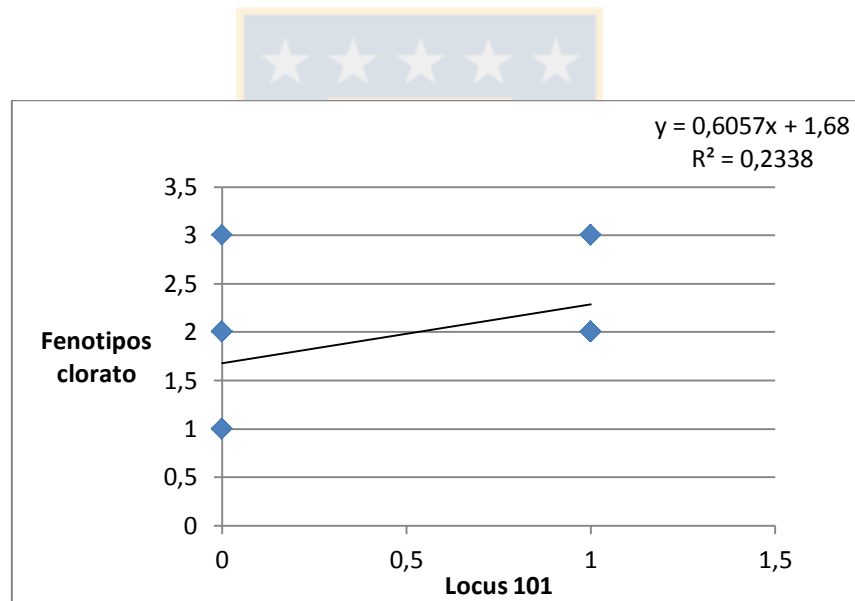
Anexo VI. Relación entre el Locus 53 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



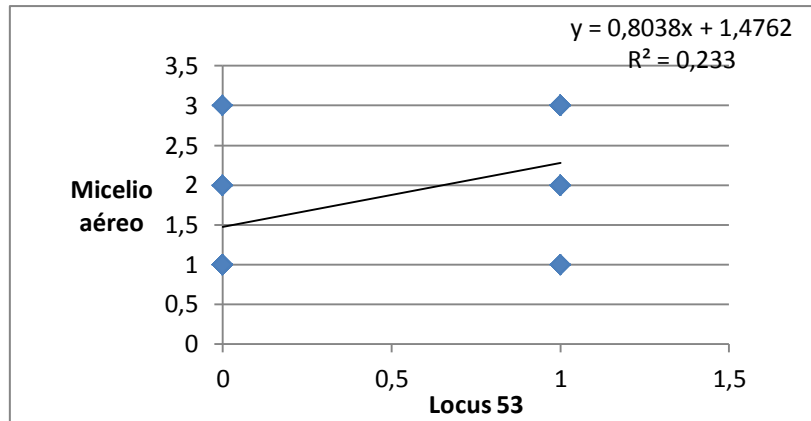
Anexo VII. Relación entre el Locus 77 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



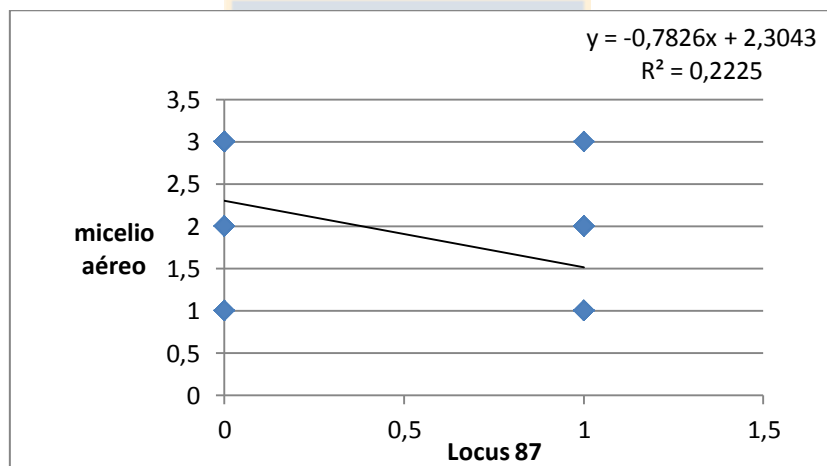
Anexo VIII. Relación entre el Locus 87 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



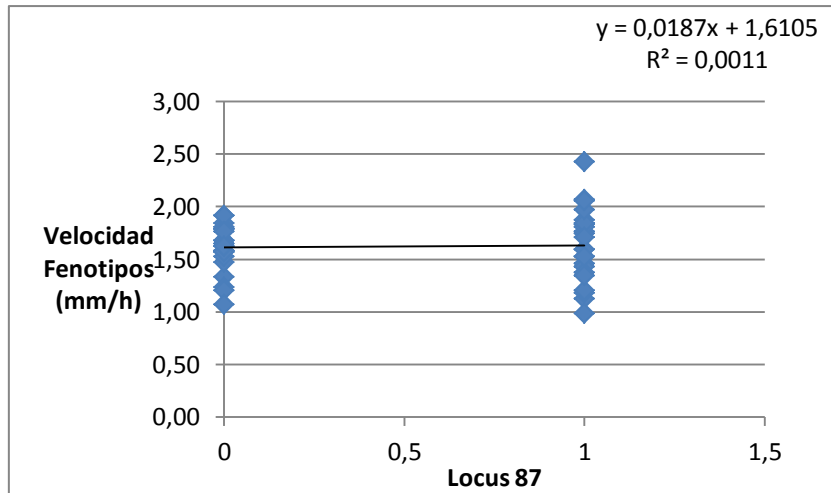
Anexo IX. Relación entre el Locus 101 con el morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



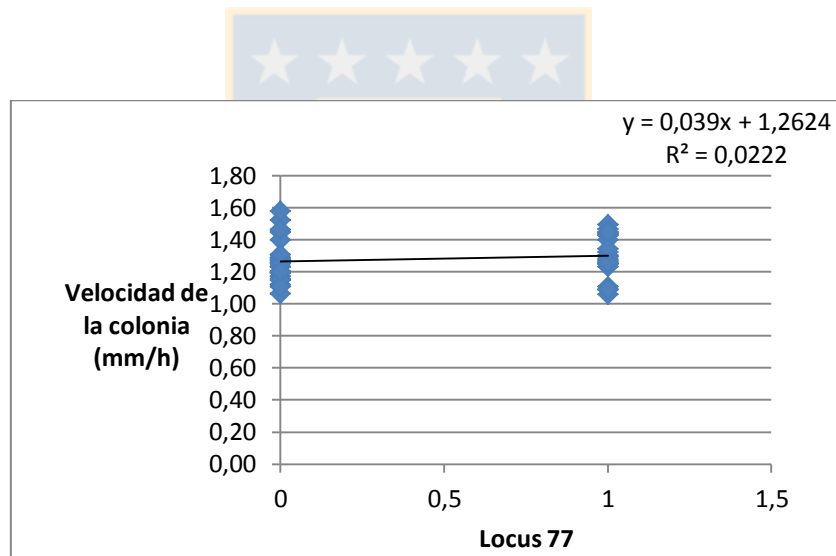
Anexo X. Relación entre el Locus 53 con el patrón de crecimiento del micelio aéreo presente en los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



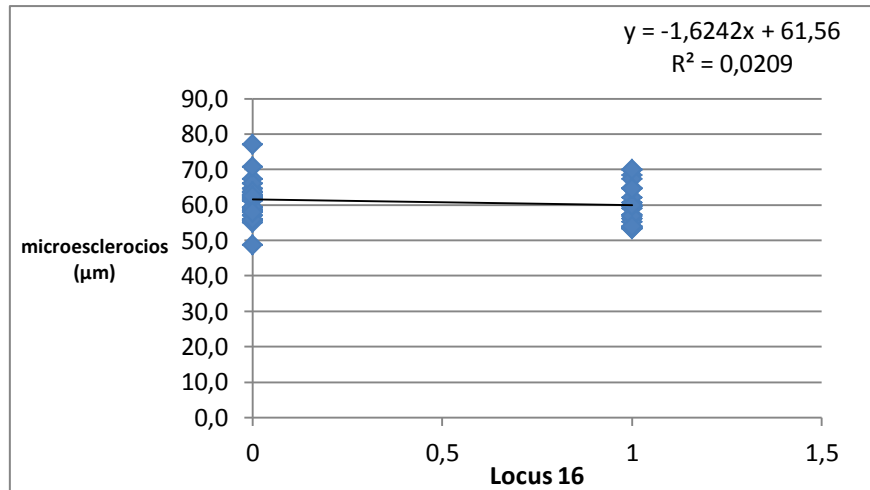
Anexo XI. Relación entre el Locus 87 con el patrón de crecimiento del micelio aéreo presente en los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



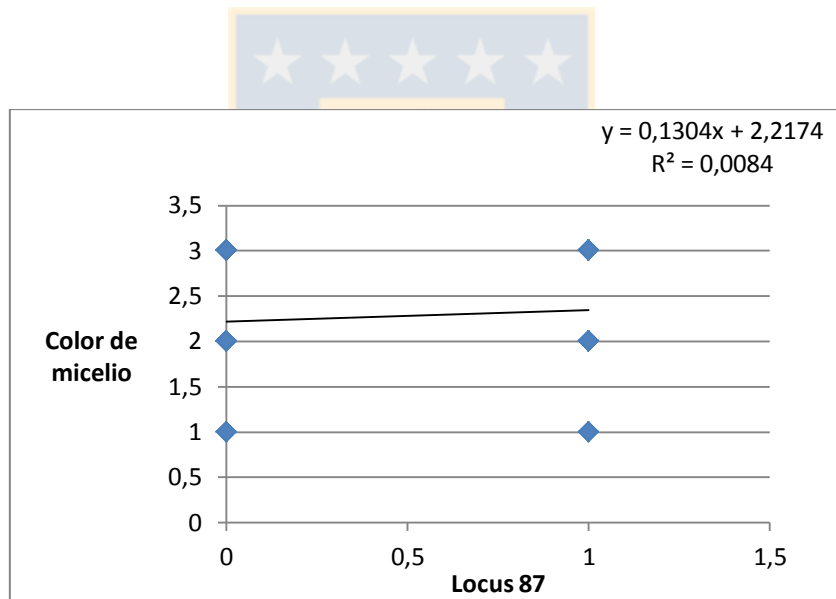
Anexo XII. Relación entre el Locus 87 con la velocidad del morfotipo de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



Anexo XIII. Relación entre el Locus 77 con la velocidad de crecimiento de la colonia de aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



Anexo XIV. Relación entre el Locus 16 con el tamaño de los microesclerocios de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.



Anexo XV. Relación entre el Locus 87 con el color de micelio de los aislados de *Macrophomina phaseolina* crecido en medio clorato.

Anexo XVI. Emergencia de las plántulas de *P. radiata* en los distintos tratamientos utilizados.

Código	Tratamiento	Repetición	Emergencia
04_E_S	C2	R1	16
04_E_S	C2	R2	14
04_E_S	C2	R3	14
45_P_P	C3	R1	17
45_P_P	C3	R2	12
45_P_P	C3	R3	13
17_P_C	C4	R1	14
17_P_C	C4	R2	11
17_P_C	C4	R3	16
19_P_C	C5	R1	16
19_P_C	C5	R2	13
19_P_C	C5	R3	19
25_P_C	C6	R1	14
25_P_C	C6	R2	17
25_P_C	C6	R3	15
47_P_P	C7	R1	17
47_P_P	C7	R2	11
47_P_P	C7	R3	16
28_P_F	C8	R1	9
28_P_F	C8	R2	12
28_P_F	C8	R3	17
Control	CC	R1	19
Control	CC	R2	4
Control	CC	R3	14