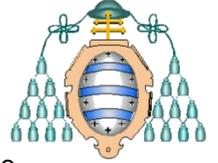




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales



Programa de Magister en Ciencias Forestales
Convenio Doble Graduación Universidad de Concepción – Universidad de Oviedo

**“Respuesta transcripcional temprana de los genes *SCL* y *COMT* y
disminución de la eficiencia del fotosistema II en plántulas de *Pinus
radiata* frente a infecciones con *Macrophomina phaseolina*”**

Tesis para optar a los Grados de Magister en Ciencias Forestales y
Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos
Vegetales

ADRIAN GARRIDO BIGOTES
CONCEPCIÓN-CHILE
2014

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

Profesora Guía: María Jesús Cañal Villanueva
Dpto. de Biología de Organismos y Sistemas, Facultad de Biología
Universidad de Oviedo

Respuesta transcripcional temprana de los genes *SCL* y *COMT* y disminución de la eficiencia del fotosistema II en plántulas de *Pinus radiata* infectadas con *Macrophomina phaseolina*.

Comisión Evaluadora:

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dr. en Biología

Eugenio San Fuentes Von Stowaser (Profesor co-guía)

Ingeniero Forestal, Dr. en Fitopatología

María Jesús Cañal Villanueva (Co-guía externo)

Licenciado en Biología, Dra. en Biología

Enrique Peñaloza Hernández (Comisión de evaluación)

Ingeniero Agrónomo, Dr. en Ciencias Biológicas

Director de Postgrado:

Regis Marcelo Teixeira Mendonça

Ingeniero Químico, Dr. en Tecnología Bioquímica

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate

Ingeniero Forestal, Dr. en Biología

Dedicatoria

A mi madre, Tere, por ser el pilar más importante y darme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar tiempo ni distancia.

A mi padre, Martín, siento que siempre estás conmigo y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

A mis hermanos por su fortaleza y apoyo.

Agradecimientos

A mi profesor guía Rodrigo Hasbún por su confianza, apoyo, disponibilidad, entusiasmo y aportes durante el desarrollo de esta tesis. A mi profesor co-guía Eugenio Sanfuentes por sus indispensables conocimientos y aportes al trabajo. A María Jesús Cañal Villanueva por actuar como co-guía externo y haberme ayudado siempre que lo requerí. A Enrique Peñaloza por haber formado parte de la comisión de evaluación de mi proyecto de tesis y haber sido partícipe en la mejora del mismo.

Al Laboratorio de Epigenética Vegetal y al Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales, al Laboratorio de Cultivos Vegetales y al Laboratorio de Patología Forestal del Centro de Biotecnología, así como al Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, y al Centro de Espectrometría y Microscopía Electrónica (CESMI), todos ellos pertenecientes a la Universidad de Concepción y donde cada uno de ellos ha aportado y permitido el desarrollo de esta tesis de magíster. A Dirección de Postgrado, Secretaría de Postgrado y Decanato de la Facultad de Ciencias Forestales, así como a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por haberme financiado para finalizar la tesis de magíster.

A la Universidad de Oviedo por la beca de movilidad internacional y a los profesores del Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales de la Universidad de Oviedo, al igual que a los profesores del Magíster en Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, pues este trabajo lleva incorporado el conocimiento de cada una de las materias impartidas por ellos.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por haber financiado el viaje entre ambas instituciones.

A mis compañeros del máster de la Universidad de Oviedo, y a los compañeros de magíster y doctorado de la Universidad de Concepción.

A Graciela y Pablo por haberme acompañado mis primeros meses en este país, en lo que sin duda desde el primer día ha sido una auténtica aventura. Sin vosotros nada hubiera sido lo mismo. Fuimos los ‘conejillos de indias’ pero lo hemos superado.

A mis amigos de España que a pesar de la distancia han sabido darme las palabras de ánimo y refuerzo cuando más lo necesitaba.

A mis amigos en Concepción, Jocelyn, Angélica, Cynthia, Paula, Giannina y un largo etc.

A ti, Angelo, por aparecer en mi vida y haberme entendido estos 4 meses en mi dedicación a tiempo completo al término de la tesis.

Y por supuesto a toda mi familia, muy especialmente a mi madre y mi recién fallecido padre, que me han demostrado su amor y apoyo incondicional desde el primer momento aun sabiendo lo que este viaje suponía. GRACIAS INFINITAS.

Estoy seguro de que se me olvidan montones de personas, a estas y a las que aquí aparecen, una vez más:

GRACIAS!!!

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNc-hs	DNA copia de hebra simple
AFLP	Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados
ANOVA	Análisis de la Varianza
APD	Agar patata dextrosa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
COMT	Ácido Cafeico 3-O-metiltransferasa
CPD	Caldo patata dextrosa
CMC	Carboximetilcelulosa
DI	Densidad de Inóculo
Dpi	Días post-inoculación
ET	Etileno
F ₀	Fluorescencia inicial
F _m	Fluorescencia máxima
F _v	Fluorescencia variable
GA ₃	Ácido giberélico
Hpi	Horas post-inoculación
JA	Ácido jasmónico
LHCII	Complejo de captación de luz
NB-LRR	Proteínas con repeticiones ricas en leucina
Proteínas PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis

FSI	Fotosistema I
FSII	Fotosistema II
rDNAsa	Nucleasa de ADN
RNAsa	Ribonucleasa
RT-PCR	PCR semicuantitativa
SCL	Scare Crow-Like factor
Tm	Tiempo de medida

Índice

Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción general	10
Pregunta de investigación	20
Hipótesis	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Capítulo I: Eventos tempranos en la inoculación de plántulas de <i>Pinus radiata</i> con <i>Macrophomina phaseolina</i> y variaciones en la eficiencia del fotosistema II.....	21
Capítulo II: Respuesta transcripcional temprana de los genes <i>SCL</i> y <i>COMT</i> en raíces de plántulas de <i>Pinus radiata</i> infectadas con <i>Macrophomina phaseolina</i>	44
Referencias bibliográficas.....	58
Discusión general	63
Conclusiones generales.....	65
Referencias bibliográficas generales.....	66

Resumen

En la interacción planta-patógeno, tras el reconocimiento del patógeno por parte del hospedero, se activa la señalización intracelular y la expresión de factores de transcripción que regulan las respuestas celulares de defensa. Entre estos factores de transcripción se encuentran genes maestros que activan otros genes de expresión tardía. Conocer estos mecanismos moleculares aportará información base a los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de estrategias orientadas a obtener variedades o clones más resistentes a las enfermedades. El estudio del transcriptoma nos permite conocer que genes se expresan después de un ataque por patógenos y el patrón de expresión en diferentes tiempos. En la actualidad, existe la posibilidad de que algunas enfermedades emergentes aumenten su incidencia y prevalencia; tal es el caso del patógeno de suelo *Macrophomina phaseolina* causante de la podredumbre carbonosa.

En esta tesis se pretenden conocer eventos tempranos de la interacción de raíces de *Pinus radiata* con el patógeno *Macrophomina phaseolina*, que permitirán en futuros estudios acotar y refinar la búsqueda de genes en etapas concretas de la interacción. Por otra parte, se estudió como la inoculación del patógeno compromete la fisiología de las plántulas mediante la medida de la eficiencia del fotosistema II en las acículas de *Pinus radiata*. Finalmente, se evaluó la expresión relativa de los genes *SCL* y *COMT* durante las etapas tempranas de la interacción.

Este trabajo es el primer reporte mediante microscopía electrónica de barrido de los eventos tempranos ocurridos tras la inoculación de plántulas de una especie de interés forestal como es *Pinus radiata*, con el patógeno *Macrophomina phaseolina*. La penetración del patógeno al interior de la raíz se produce alrededor de las 48 horas post-inoculación (hpi), siendo evidente la colonización superficial y numerosos puntos de penetración una vez transcurridas las 72 hpi. La eficiencia del fotosistema II muestra variaciones una vez ocurridos estos sucesos, concretamente una disminución de los valores F_v/F_m a partir de las 120 hpi. Los resultados demuestran la virulencia del patógeno a las pocas horas una vez ocurrido el contacto con la raíz, y como este hecho provoca un estrés fisiológico en la planta. A pesar de lo anteriormente descrito, a nivel transcripcional no se observaron diferencias significativas en la acumulación de los transcritos correspondientes a los genes *SCL* y *COMT* en plántulas inoculadas.

Abstract

In plant-pathogen interactions, the recognition of pathogen activates intracellular signaling and the expression of transcription factors that regulate cellular responses to stop the spread of the pathogen. Among these transcription factors are 'master switch' genes that activate late gene expression. The knowledge of these molecular mechanisms will provide tools to breeding programs for the development of strategies to obtain disease-resistant varieties or clones. The transcriptome study allows us to know whether these genes are expressed after pathogen attack, as well as their expression pattern at different times. Currently, it is possible that some emerging diseases increase in incidence and prevalence, as in the case of the pathogen *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot.

This work is intended to know the early events of the interaction of roots of *Pinus radiata* with the pathogen *Macrophomina phaseolina*, which allow us to define and refine the search for genes of interest that increase or decrease their expression in specific stages of the host interaction -pathogen. Moreover, how the pathogen inoculation compromised the seedling physiology by measuring the efficiency of photosystem II of *Pinus radiata* needles was studied. Finally, the relative expression of *SCL* and *COMT* candidate genes was evaluated for early stages of interaction.

This is the first report on early events occurring after the inoculation of seedlings in a species of forest interest (*Pinus radiata*), with the pathogen causing charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*). The penetration of pathogen into the root occurs at 48 hours post-inoculation, with visible surface colonization and presence of many penetration points after 72 hours after inoculation. The chlorophyll *a* fluorescence parameters to show variations at stages of fungal colonization such a decrease in F_v/F_m values starting from 120 hours post-inoculation. These results demonstrate the virulence of the pathogen at few hours after contact with the root and that virulence causes a physiological stress on the plant that results in the variation of the parameters of the chlorophyll *a* fluorescence. Significant differences were not observed in the expression of *SCL* or *COMT* genes in inoculated seedlings.

Introducción general

Las plantas se encuentran sometidas constantemente a cambios en el medio ambiente, tales como factores abióticos (radiación, salinidad, etc.) y factores bióticos (malezas, patógenos, plagas, etc.). Como resultado de las relaciones planta-microorganismo patógeno aparecen las enfermedades que son debidas a interacciones hospedador-patógeno compatibles (Glazebrook, 2005). Los agentes causales de enfermedades pueden ser bacterias, hongos, virus, viroides y fitoplasmas, y los mecanismos de defensa de las plantas frente a estos son constitutivos o inducibles (Odjakova y Hadjiivanova, 2001). La infección por fitopatógenos conduce a cambios en el metabolismo secundario basado en la inducción de los mecanismos de defensa así como a cambios en el metabolismo primario que afectan el crecimiento y desarrollo de la planta, y dependiendo de si el patógeno es biotrofo o necrotrofo las vías metabólicas defensivas activadas van a ser diferentes (Berger *et al.*, 2007a). La defensa exitosa depende del reconocimiento temprano del patógeno y de la activación de respuestas defensivas adecuadas (van Verk *et al.*, 2009). Tras un primer contacto con el patógeno o con elicitores y otros tipos de moléculas se activa la producción de moléculas señal tales como ácido jasmónico (JA) o etileno (ET), la fosforilación/desfosforilación de proteínas así como de especies reactivas de oxígeno (Berger *et al.*, 2007a). Esto conduce a la regulación de la expresión génica y la inducción de respuestas de defensa, por ejemplo, la acumulación de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) (Ahuja *et al.*, 2012), engrosamiento de la pared celular, producción de especies reactivas de oxígeno, producción de lipooxigenasas, etc. (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Detección de patógenos y vías de transducción de la señal

El sistema de reconocimiento de patógenos consiste en receptores de membrana que reconocen moléculas de los patógenos que son presentadas por este durante el proceso infeccioso, y proteínas de resistencia intracelulares para reconocer proteínas efectoras del patógeno en las células hospedadoras. Estas proteínas efectoras son las NB-LRR (proteínas con repeticiones ricas en leucina) cuya función principal es reconocer diversas proteínas del

patógeno e iniciar una respuesta defensiva, incluyendo la activación de factores de transcripción (Elmore *et al.*, 2011). En un trabajo desarrollado por Zhang y Wang (2005), se encontró que la superfamilia de los factores de transcripción WRKY estaban implicados en muchos procesos, entre ellos el estrés abiótico y biótico. Además, concluyeron que eran inducidos tempranamente y que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, entre ellos en el pino, entre otros vegetales, y este ha sido encontrado concretamente en *Pinus radiata* D. Don frente a la infección por el patógeno *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx. (Frías, 2012). Otro factor de transcripción implicado en la respuesta frente a estrés es el SCL (Scare Crow Like Factor) (Gosal *et al.*, (2009), y que también está implicado en la defensa de *P. radiata* frente a *D. pinea* (Frías, 2012). En la Figura 1 se muestra un modelo de la señalización en la interacción planta-patógeno.

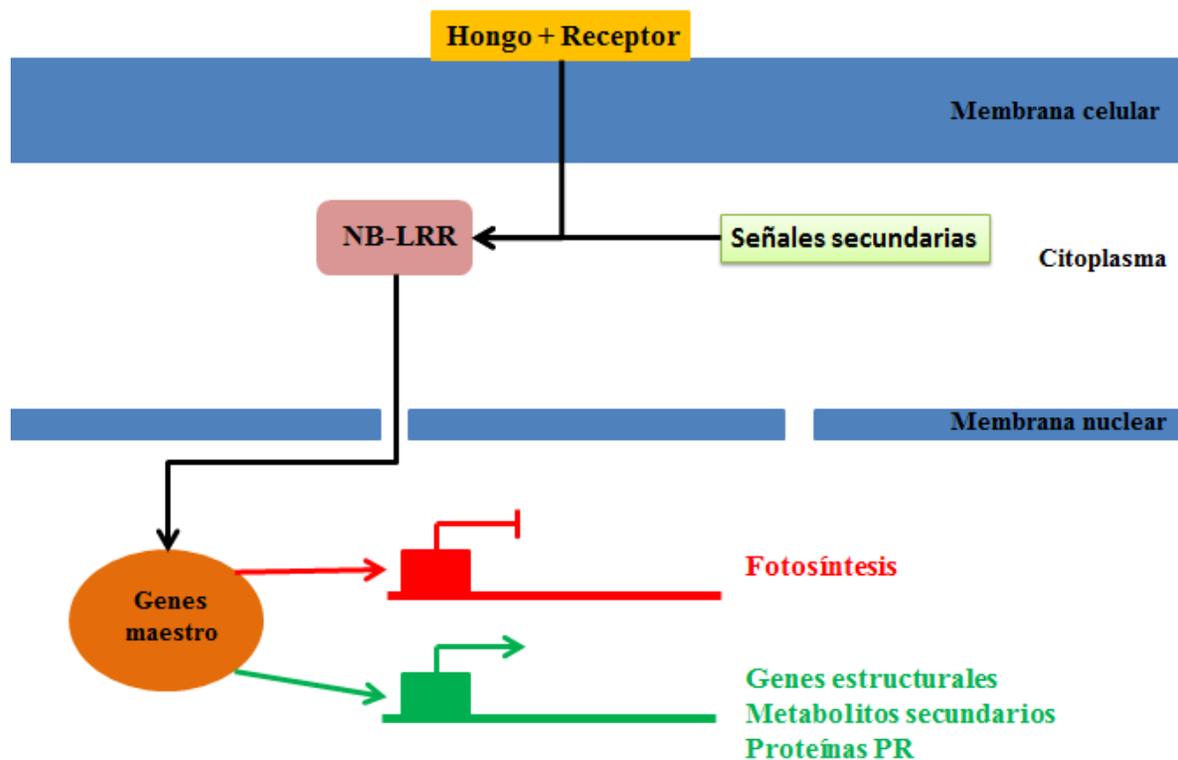


Figura 1. Modelo de señalización intracelular en la interacción planta-patógeno.

Alteraciones estructurales

Debido a la presencia y reconocimiento del patógeno es común, como mecanismo de defensa inducido por patógenos el reforzamiento de la pared celular mediante la deposición de nuevo material sobre está, constituyendo estructuras denominadas papilas (Nicaise *et al.*, 2009), cuya composición varía entre especies, pero que está constituida básicamente por calosa, lignina y proteínas estructurales de pared celular (Zeyen *et al.*, 2002). La deposición de lignina sobre las paredes celulares está entre los principales mecanismos de defensa estructurales a nivel de pared celular vegetal (Freeman *et al.*, 2014). En especies forestales del género *Eucalyptus* ha sido observada la biosíntesis de lignina en paredes celulares secundarias en zonas de heridas o de ataques por patógenos (Hawkins y Boudet, 2003). Una de las principales enzimas de la ruta biosintética de la lignina es la Ácido Cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT) (Eckardt, 2002).

Alteraciones metabólicas

Metabolismo primario

El ataque de patógenos resulta en una disminución de la tasa fotosintética (Kocal *et al.*, 2008) y, como consecuencia, pérdidas en la producción. La fluorescencia de la clorofila es un marcador muy sensible para conocer la eficiencia de la fotosíntesis, proceso que es afectado por la exposición al patógeno. Pero la infección por patógenos no solamente provoca cambios en la fluorescencia de la clorofila, sino también en la acumulación de azúcares y en el metabolismo de los productos fotosintéticos (Berger *et al.*, 2007a). Además, en las interacciones planta-patógeno sugieren se ve afectado el proceso de intercambio gaseoso, debido al cierre estomático que termina por disminuir la tasa de fotosíntesis neta (Omari *et al.*, 2001). Esto se ve apoyado por otros estudios en especies forestales donde también se muestran diferencias significativas en los parámetros de intercambio gaseoso entre plantas susceptibles infectadas y no infectadas (Alonso *et al.*, 2011). La afectación en el proceso fotosintético medido mediante fluorescencia, puede ser detectado incluso antes de la aparición de los

síntomas específicos de la enfermedad, como se ha demostrado mediante medida de la misma con fluorímetros y técnicas de imagen (Sebela *et al.*, 2012).

La energía lumínica es absorbida por la clorofila y empleada en fotosíntesis, el exceso de energía es disipado en forma de calor o emitido como fluorescencia. El desvío de la energía a uno de estos procesos va en detrimento de los otros dos. La fluorescencia tiene una longitud de onda mayor que la absorbida por la clorofila, y puede ser medida por exposición de la hoja de una planta a luz de una longitud de onda definida y medir la luz emitida a longitudes de onda más largas (Maxwell y Johnson, 2000). La fluorescencia de la clorofila *a* aporta básicamente información sobre la eficiencia del fotosistema II (FSII), el cual es indicativo de la tasa de fotosíntesis. El daño del FSII es a menudo el primer síntoma de estrés y el que más daño sufre inducido por luz. Esta medida da la posibilidad de conocer el rendimiento fotosintético, en condiciones en las que otros métodos podrían fallar (Maxwell y Johnson, 2000).

Metabolismo secundario y proteínas relacionadas con la patogénesis

Las plantas producen una alta diversidad de metabolitos secundarios para protegerse frente a los predadores y los microorganismos patógenos, algunos de los cuales también están implicados en las respuestas frente a factores de tipo abiótico, en la comunicación de señales con otros organismos (Schafer *et al.*, 2009, citado por Mazid *et al.*, 2011). Los tres grupos mayoritarios de metabolitos secundarios son terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.), fenoles (flavonoides, taninos, etc.) y compuestos con nitrógeno y azufre (fitoalexinas, defensinas, etc.) (Mazid *et al.*, 2011).

En último término las respuestas defensivas de las plantas están representadas por las proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis), las que se acumulan en respuesta a patógenos, estreses abióticos y resistencia sistémica adquirida. Son varias las especies forestales donde se han descrito estos genes y sus proteínas como *Pinus* spp., *Eucalyptus* spp., *Populus* spp., etc. Concretamente, en *Pinus* han sido encontradas quitinasas (familia PR-3), proteínas tipo taumatina (familia PR-5), peroxidasas (familia PR-9), miembros de la familia PR-10, proteínas transportadoras de lípidos (familia PR-14), proteínas 14-3-3 y lectinas, entre otras (Veluthakkal y Ghosh, 2010).

Estudio del transcriptoma en infecciones por patógenos

Para una mejor comprensión de las relaciones entre el genoma y las funciones celulares se estudian los productos del genoma: ARNs expresados y proteínas. Las proteínas puede ser que no alberguen toda la historia celular, ya que son dinámicas, interactúan con moléculas, sufren cambios post-traduccionales, etc. Estudiar los ARNm, ayudará a establecer relaciones entre el código genético y las moléculas funcionalmente activas. Todas las células tienen los mismos genes, pero no en todas existe el mismo patrón de expresión y esto se traduce en una amplia variedad de diferencias físicas, bioquímicas y del desarrollo en células y tejidos y podrían jugar un papel muy importante en los estadios sano y enfermo. El transcriptoma no cuenta únicamente con el estudio de los ARNm, sino también de otros tipos de ARN (Adams, 2008).

La identificación de las vías defensivas a nivel bioquímico y genético en los patosistemas de árboles está comenzando a ser tratadas, pues son importantes desde el punto de vista ambiental y ecológico. Los mecanismos fisiológicos y bioquímicos en plantas leñosas perennes en respuesta a los patógenos son homólogos al género modelo *Arabidopsis*, pero su metabolismo secundario y sus estrategias de supervivencia divergen. La domesticación limitada de las especies forestales hace que sus mecanismos moleculares sean menos comparables con las especies cultivadas. Se ha sugerido que la posible diferencia en los programas genéticos que responden a patógenos en especies anuales y perennes podrían tener un patrón espacial y temporal de regulación génica (Veluthakkal y Ghosh, 2010).

El mayor inconveniente a la hora de descifrar de los fenómenos moleculares que ocurren en los árboles se atribuye a los largos tiempos de generación y al gran tamaño de árboles adultos (Elfstrand *et al.* 2001). Durante el estudio de estas interacciones planta-patógeno se han reportado numerosas familias génicas que aumentan o disminuyen su expresión, como genes que codifican enzimas implicados en la vía fenilpropanoide, proteínas fungicidas, proteínas de shock térmico, proteínas reguladoras y proteínas relacionadas con la patogénesis (Veluthakkal y Ghosh, 2010), así como factores de transcripción del tipo WRKY (Zhang y Wang, 2005) o SCL (Gosal *et al.*, 2009).

Los factores de transcripción son los encargados de regular la expresión del genoma ante las señales ambientales y fisiológicas. Están codificados por unos pocos genes

denominados “master switch” o genes maestro, que regulan la expresión de varios otros, lo que lleva a la activación de mecanismos adaptativos complejos, y por lo tanto representan importantes dianas moleculares para la mejora genética de las plantas frente a los diferentes estreses (Khong *et al.*, 2008). Estos genes principales han sido principalmente identificados en la especie agrícola *Oryza sativa* L. (Singh *et al.*, 2012).

El estudio temprano del transcriptoma de la planta reveló que muchos genes asociados a la fotosíntesis son reprimidos después del ataque de un agente biótico (Berger *et al.*, 2007b). En una investigación desarrollada por Bilgin *et al.*, (2010) se observó que los genes que codifican proteínas de los centros de reacción del fotosistema I (FSI) y FSII, ATP sintasa y varios elementos del complejo de captación de luz (LHCII) asociados con el FSII disminuyeron su expresión por el daño biótico. Sin embargo, otros genes como la ferredoxina aumentaron su expresión (Bilgin *et al.*, 2010).

Otros estudios transcriptómicos se han llevado a cabo para conocer como varía la expresión en los genes del metabolismo primario y en genes del metabolismo secundario, especialmente los relacionados con la defensa en varios géneros de coníferas, entre ellos, *Picea* (Johnk *et al.*, 2005) y *Pinus* (Adomas *et al.*, 2007) posterior a la infección con patógenos fúngicos. Johnk *et al.* (2005) estudió los mecanismos de defensa, mediante la acumulación de transcritos, de las raíces de picea noruega cuando esta fue inoculada con *Ceratobasidium bicorne* Erikss. y Ryv, y encontró diferentes isoformas de peroxidasas, glutatión s-transferasa y quitinasas de clase IV, junto con las proteínas de resistencia NB-LRR. Frías (2012) estudió la expresión de varios genes relacionados con defensa (genes *PR*) y los factores de transcripción WRKY y SCL en *P. radiata* tras inoculación con *D. pinea*. Por otro lado, la Ácido Cafeico 3-O-metiltransferasa es una de las principales enzimas para la biosíntesis de pared celular (Eckardt, 2002) y se ha visto que el precursor del enzima se acumula en mutantes de *A. thaliana* (Quentin *et al.*, 2009).

Tiempos de medida de los niveles de expresión

Hasta la fecha muchos de los estudios transcriptómicos llevados a cabo para estudiar la expresión génica cuando la planta es infectada por un patógeno utilizan tiempos de muestreo que oscilan, en general, entre las 24 h y varios días post-inoculación (Adomas *et al.*, 2007).

Sin embargo, hay pocos estudios donde se considera la evaluación de las respuestas defensivas a nivel de transcripción de forma temprana, es decir, a las pocas horas una vez transcurrida la inoculación. Seidenberger *et al.*, (2005) realizan la toma de muestras en tiempos más cercanos a la inoculación desde las 6 h hasta las 168 hpi. En un estudio transcriptómico de raíces de *Medicago truncatula* Gaetn. infectadas con *M. phaseolina* las muestras fueron tomadas entre las 24 y las 48 h (Mah *et al.*, 2012).

***Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.**

M. phaseolina (Tassi.) Goid. es una especie de hongo, patógeno de suelo, causante del marchitamiento de las plántulas y de la podredumbre carbonosa de raíces, tallo y vainas de más de 500 especies de plantas (Sinclair, 1982). Afecta a especies agrícolas, árboles frutales, malas hierbas (Songa y Hillocks, 1996) y coníferas (McCain y Scharpf, 1989). También genera podredumbre carbonosa en especies de pino como *P. radiata* (Muñoz, 2006).

Este hongo se encuentra distribuido por todo el mundo, siendo su incidencia y prevalencia más alta en países tropicales y subtropicales con climas áridos o semiáridos. En Chile la enfermedad fue por primer vez reportada en viveros forestales de *P. radiata* D. Don en 1983 (Butin y Peredo, 1986), y se sabe que muchas especies nativas de los géneros *Araucaria* o *Nothofagus*, entre otras, son también susceptibles al patógeno (Hinojosa, 1997), y en España parece ser importante únicamente en especies de interés agrícola como *Glycine max* L. Merrill (Jiménez-Díaz y Montes-Agustí, 1974), entre otras, pues hasta la fecha no ha sido reportado ningún caso en especies forestales (comunicación personal).

Ciclo de enfermedad y factores de virulencia

M. phaseolina es un hongo que persiste en el suelo en forma de microesclerocios (Figura 2) durante largos periodos de tiempo, hasta aproximadamente 15 años, donde resisten condiciones ambientales adversas (Short *et al.*, 1980). Una vez que se produce el contacto de los microesclerocios con las raíces en crecimiento, estos germinan, comienza el crecimiento superficial de las hifas y estas penetran la epidermis de la corteza radicular. El hongo continúa la colonización por la corteza y alcanza la raíz principal, degradando el tejido radicular y las

plántulas frenan su crecimiento, muestran clorosis y finalmente mueren. En los últimos estadios del ciclo se forman pequeños esclerocios de color negro en la corteza interior de las raíces y de la parte inferior del tallo. Cuando la planta muere, los microesclerocios son liberados, y servirán como nuevo inóculo primario para las nuevas plántulas (Smith *et al.*, 1969). La germinación de los microesclerocios es estimulada por exudados radiculares de sus hospedadores (Papavizas, 1977) y el que ocurra o no el ciclo de vida completo del patógeno es influenciado por ciertos componentes abióticos como el estrés hídrico y temperaturas elevadas (30-40° C), que potencian el inicio y severidad de la enfermedad (Meyer y Sinclair, 1974). Los modelos de cambio climático indican que las temperaturas medias aumentarán 3-5 °C en los próximos 50-100 años (IPCC 2007), lo que provocará mayores periodos de sequía y olas de calor (IPCCM 2008) y esto favorecerá el ciclo de vida de este patógeno. En la Figura 3 aparece representado el ciclo de enfermedad del patógeno.

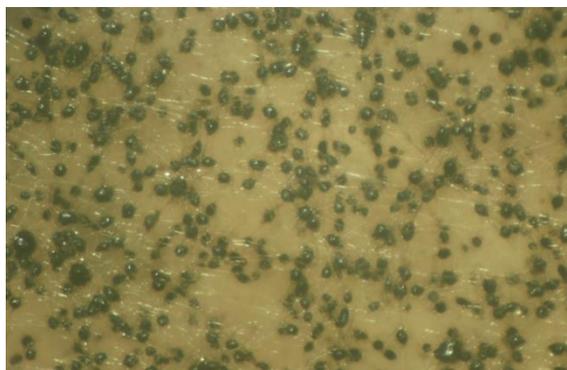


Figura 2. Microesclerocios de *M. phaseolina* sobre medio APD.

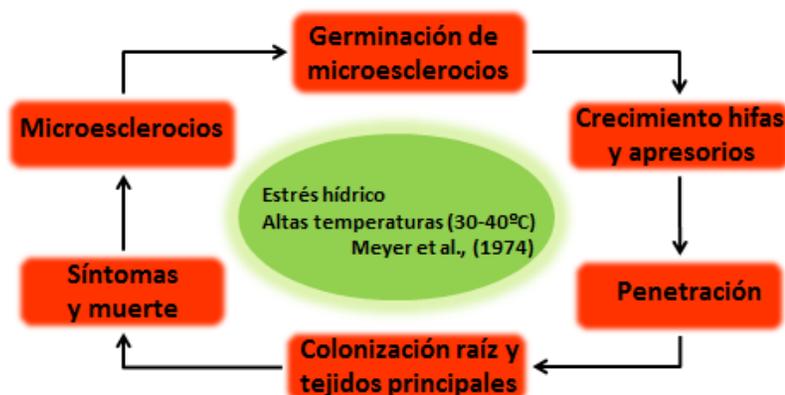


Figura 3. Ciclo de vida del patógeno *M. phaseolina*. Adaptado de Smith *et al.*, (1969)

Los efectos nocivos de *M. phaseolina* sobre las plántulas vienen determinados por un grupo de factores de virulencia que inician y permiten el desarrollo de la infección. La penetración al interior de la célula hospedadora es llevada a cabo mediante enzimas que degradan la pared celular. Wang y Jones (1995) determinaron una endoglucanasa que explica la penetración al interior de las células sea efectiva. *M. phaseolina* también produce una serie de micotoxinas como la asperlina, isoasperlina, formalactona, ácido faseolínico y faseolinona (Dhar *et al.*, 1982, citado en Kaur *et al.*, 2012). Han sido identificadas numerosas enzimas que degradan carbohidratos (esterasas), enzimas que degradan lignina (lacasas, lignina peroxidasa, etc.) y micotoxinas considerándolo como uno de los patógenos necrotrofos más destructivos (Islam *et al.*, 2012).

Síntomas de la infección

M. phaseolina es el agente causal de la podredumbre carbonosa pero, en algunas ocasiones, puede provocar damping-off o caída de las plántulas (Barnard, 1996). A partir de lesiones iniciales hay una expansión que termina con el marchitamiento de la planta (Kaur *et al.*, 2012). Los síntomas que se observan en las raíces son el ennegrecimiento de la parte distal de la raíz principal y las raíces laterales, mientras que los síntomas de la parte aérea son detención del crecimiento, clorosis, marchitez o muerte (Smith *et al.*, 1989, Shaner *et al.*, 1999).

Interacción *M. phaseolina*-hospedadores

Los primeros estudios llevados a cabo para conocer la interacción de *M. phaseolina* en raíces de *G. max* (Ammon *et al.*, 1974, 1975). El estudio a nivel de superficie de las raíces reveló detalles del tiempo de germinación de los microesclerocios, del patrón de crecimiento de las hifas y de la formación de los apresorios (Ammon *et al.*, 1975). Investigaciones posteriores han intentado conocer más sobre la evolución temporal y espacial del proceso infectivo de este patógeno. Joye y Paul, (1992) estudiaron la interacción de *M. phaseolina* con la planta acuática *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle reportaron que en menos de 40 horas tras la inoculación ocurre la penetración de la pared celular, observándose una colonización evidente después de las 196 hpi. Bressano *et al.*, (2010) observaron periódicamente la

penetración de las raíces de soja, así como la colonización interna tanto intercelular como intracelular. Gaige *et al.*, (2010) empleo la especie *M. truncatula* y como inóculo de *M. phaseolina* los esclerocios, y observó la germinación y la penetración de las raíces 1 día post-inoculación, la colonización una vez transcurridos 2 días de la inoculación, y la formación de nuevos esclerocios a los 3 y 4 días post-inoculación (dpi).

Estudios transcriptómicos en plantas infectadas con *M. phaseolina*

Mah *et al.* (2012) emplearon el patosistema *M. truncatula* – *M. phaseolina* para estudiar las respuestas a nivel molecular. En un estudio previo de Gaige *et al.* (2010), las plantas infectadas mostraban síntomas de marchitamiento y decoloración de las hojas un día después de la inoculación y muchas de las plantas morían a los cuatro días después de la infección. Los estudios de microscopía revelaron que la penetración del patógeno se producía a las 24 h y la colonización era rápida transcurridas las 36-48 h (Mah *et al.*, 2012). Analizaron el transcriptoma de las raíces de *M. truncatula* inoculada con *M. phaseolina* en la etapa de penetración del patógeno (24 h) y en las etapas de colonización (36 y 48 h) y fueron estudiados principalmente genes relacionados con el metabolismo secundario (Mah *et al.*, 2012).

Pregunta de investigación

Después de inocular raíces de plántulas de *P. radiata* con *M. phaseolina*, ¿cuál es el evento del ciclo de enfermedad donde se detectan los primeros cambios a nivel de la eficiencia del fotosistema II y de expresión de los genes *SCL* y *COMT*?

Hipótesis

Los cambios a nivel de la eficiencia del fotosistema II y de expresión de los genes *SCL* y *COMT* se producen luego de que ocurre la penetración de *M. phaseolina* en el tejido radicular de *P. radiata*.

Objetivo general

Identificar el evento del ciclo de enfermedad que determina el inicio de cambios a nivel de la eficiencia del fotosistema II y de expresión de los genes *SCL* y *COMT* luego de inocular tejido radicular de *P. radiata* con *M. phaseolina*.

Objetivos específicos

- Definir un sistema experimental de inoculación de plántulas de *P. radiata* con *M. phaseolina* y caracterizar las primeras fases de la interacción planta-patógeno.
- Relacionar los cambios ocurridos a nivel histológico con los cambios en la eficiencia del fotosistema II y de expresión de los genes *SCL* y *COMT*.

Capítulo I: Eventos tempranos en la inoculación de plántulas de *Pinus radiata* con *Macrophomina phaseolina* y variaciones en la eficiencia del fotosistema II

Introducción

Las plantas son afectadas por factores abióticos (estrés hídrico, salino,...) , y bióticos (microorganismos, insectos,...) que determinan su éxito en el medio ambiente. Muchos de estos microorganismos se comportan como patógenos, y el resultado de las interacciones planta-microorganismo patógeno compatibles es la aparición de enfermedades (Glazebrook, 2005). Entre los microorganismos patógenos en plantas encontramos hongos, bacterias, virus, nematodos y otros parásitos (Okubara y Paulitz, 2005). Los hongos se clasifican en función de su relación con el hospedero en necrotrofos, que se alimentan de tejidos muertos, y biotrofos, que viven a expensas de los tejidos de un hospedador vivo (Glazebrook, 2005).

Estas interacciones planta-hongo patógeno conducen a cambios a nivel de metabolismo primario que afectan al crecimiento y al desarrollo (Berger *et al.*, 2007), y a nivel del metabolismo secundario (Mazid *et al.*, 2011), y frente a los ataques por patógenos las plantas responden con mecanismos de defensa constitutivos o inducibles (Ođjakova y Hadjiivanova, 2001). En cuanto al metabolismo primario, el ataque de patógenos resulta en una disminución de la tasa fotosintética (Kocal *et al.*, 2008). La fluorescencia de la clorofila *a* y los parámetros a través de los cuales se mide (F_0 y F_v/F_m) son marcadores muy sensibles para conocer la eficiencia fotosintética (Maxwell y Johnson, 2000) y este proceso se ve afectado por la exposición a patógenos (Luque *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 2006, Alonso *et al.*, 2011).

Por otra parte, los hongos pueden provocar enfermedad en cualquier tejido u órgano de la planta, y en función de esto pueden ser clasificados en hongos patógenos foliares y hongos patógenos de raíces (Okubara y Paulitz, 2005). Los patógenos necrotrofos de las raíces no poseen un alto grado de especificidad por el hospedador, como ocurre en los patógenos biotrofos de hojas y raíces. Entre los hongos patógenos del raíces encontramos a los géneros *Rizhoctonia*, *Phytium*, *Phytophthora* (Okubara y Paulitz, 2005), *Macrophomina* (Kaur *et al.*, 2012), entre otros. Muchos de estos hongos son capaces de penetrar a través de la epidermis de la raíz y tienen estructuras de resistencia cuando el hospedador no está presente (Okubara y

Paulitz, 2005). No obstante, debido a que la interacción ocurre en el suelo, es difícil conocer cómo se desarrollan los procesos de infección y colonización (Bais *et al.*, 2006).

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid es un hongo necrotrofo del suelo que causa la podredumbre carbonosa en más de 500 especies de plantas, (Kaur *et al.*, 2012), afectando entre otras a especies de coníferas (McCain y Scharpf, 1989). *Pinus radiata* D. Don es una de las especies de coníferas más afectada por el patógeno (Muñoz, 2006). Este patógeno tiene distribución mundial, y su incidencia y prevalencia es mayor en regiones tropicales y subtropicales con climas áridos y semiáridos. En Chile, la enfermedad fue reportada por primera vez en viveros forestales en 1983 (Butin y Peredo, 1986), y las especies nativas también han mostrado susceptibilidad al patógeno (Hinojosa, 1997). Los síntomas en las raíces son ennegrecimiento de la raíz principal y las raíces laterales, y en la parte aérea detención del crecimiento, clorosis, marchitamiento y muerte, y la mayoría de estos no son detectados en los primeros estadios de la infección (Smith *et al.*, 1989).

M. phaseolina es un hongo que persiste en el suelo en forma de microesclerocios durante largos periodos de tiempo, hasta aproximadamente 15 años (Short *et al.*, 1980). Una vez ocurre el contacto de los microesclerocios con las raíces en crecimiento, estos germinan, comienza el crecimiento superficial de las hifas y estas penetran la epidermis radicular. En *G. max* la penetración se produce por un mecanismo de presión mecánica generada por los apresorios (Ammon *et al.*, 1975) o hifopodios (Chowdury *et al.*, 2014). Una vez ha penetrado, el hongo continúa la colonización (Ammon *et al.*, (1974) y alcanza el tejido vascular (Chowdury *et al.*, 2014), las plántulas frenan su crecimiento, muestran clorosis y finalmente mueren. En los últimos estadios del ciclo se forman pequeños microesclerocios de color negro en la corteza interior de las raíces y de la parte inferior del tallo. Cuando la planta cae al suelo, los microesclerocios se liberan al suelo y servirán como nuevo inóculo primario para las plántulas (Smith *et al.*, 1969). El que ocurra o no el ciclo de vida completo del patógeno se ve influenciado por ciertos componentes abióticos que potencian el inicio y severidad de la enfermedad como los exudados radiculares (Smith (1969), el estrés hídrico y temperaturas elevadas (30-40° C), (Meyer *et al.*, 1974).

El objetivo de este estudio fue definir un sistema experimental de inoculación de plántulas de *P. radiata* con *M. phaseolina*, caracterizar las primeras fases de la interacción planta-patógeno y relacionar los cambios ocurridos a nivel histológico con los cambios en la eficiencia del fotosistema II.

Materiales y métodos

Material vegetal

Esterilización previa de la superficie de las semillas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 15 minutos y enjuagado tres veces con agua destilada estéril durante 10 minutos. Posteriormente, las semillas fueron embebidas en agua durante 24 horas y otras 24 horas en una solución de giberelinas (GA₃) a una concentración de 300 mg/L. Una mezcla de semillas de *P. radiata* fueron germinadas siguiendo el método descrito previamente por Adomas *et al.*, (2007) modificado: esterilización previa de la superficie de las semillas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 15 minutos y enjuagado tres veces con agua destilada estéril durante 10 minutos. Se sembraron en medio agar agua al 1%. Se incubaron posteriormente a 20°C en oscuridad hasta la germinación. Las plántulas fueron transferidas a cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 horas y temperatura de 25° C hasta los 25 días de edad.

Patógeno y producción de inóculo

La cepa de *M. phaseolina* que se empleó en la inoculación se aisló a partir de suelos donde estaba presente *P. radiata*. *M. phaseolina* se creció en medio semisólido de agar-patata-dextrosa (APD) a una temperatura de 25° C. Los microesclerocios fueron producidos en matraces con caldo-patata-dextrosa (CPD) a partir de discos de micelio durante 21 días en oscuridad a una temperatura de 31° C. Posteriormente, se secaron y tamizaron entre 45 y 200 µm.

La viabilidad se realizó sobre medio APD depositando microesclerocios individuales sobre el medio y sobre raíces de plántulas de *P. radiata*, y en ambos casos fueron incubadas a

25° C. Se calculó la viabilidad de los microesclerocios como porcentaje de germinación de 30 microesclerocios en medio APD y de 20 microesclerocios sobre la superficie de las raíces de las plántulas por medio de lupa binocular.

Método de inoculación

El procedimiento de inoculación fue el siguiente (Figura 4): las raíces de las plántulas de 25 días de edad se sumergieron en carboximetilcelulosa (CMC) al 1%, se transfirieron a una placa de Petri con papel filtro húmedo estéril y se inocularon a lo largo de 1 cm a partir del ápice, depositando 10 microesclerocios sobre cada raíz (Figura 4A). Las plántulas control fueron únicamente sumergidas en CMC al 1% (Figura 4B). La zona de las raíces se cubrió con papel de aluminio. A continuación, se incubaron las plántulas a 25° C hasta la toma de muestras.

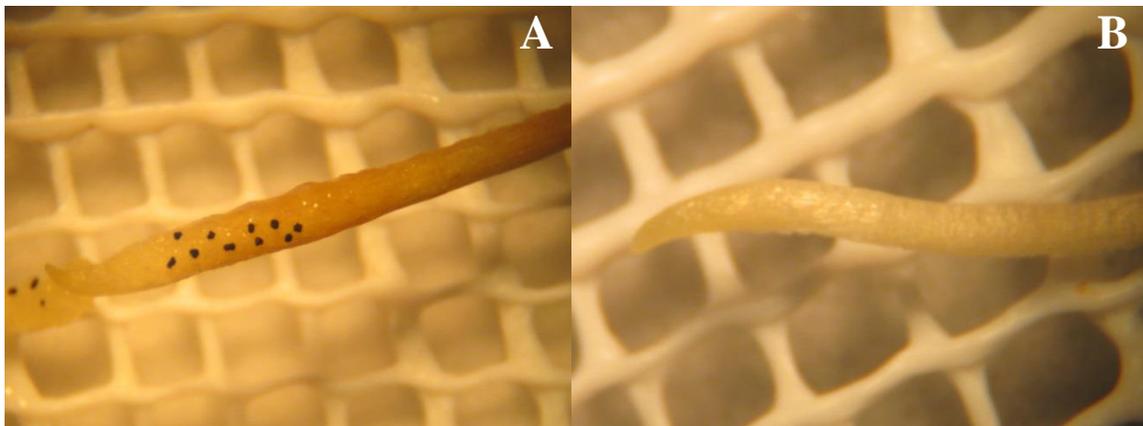


Figura 4. Sistema de inoculación de raíces de plántulas de *P. radiata* con microesclerocios de *M. phaseolina*. A) Raíz de plántula inoculada de *P. radiata*. B) Raíz de plántula control de *P. radiata*.

Evaluación del proceso de infección

Se tomaron las raíces a distintos tiempos post-inoculación 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h, y se fijaron con glutaraldehído 2.5 %. Luego se lavaron en buffer fosfato, se deshidrataron con alcohol y fueron sometidas a secado a punto crítico. Finalmente, las muestras fueron observadas con el microscopio. Se evaluaron dos réplicas por cada tiempo de muestreo.

Evaluación de la eficiencia del fotosistema II

Se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en plántulas control y en plántulas inoculadas con Handy PEA (Hansatech, UK), a varios tiempos post-inoculación (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h). El parámetro empleado para evaluar la eficiencia del FSII fue $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$ (Rosenqvist y van Kooten, 2003). En primer lugar se determinó la fluorescencia inicial (F_0) por exposición de las acículas de la plántula a $6 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Posteriormente, se aplicó un pulso de luz saturante de $9000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ durante 0.8 s para determinar el máximo de emisión de fluorescencia (F_m). Se recopilaron los datos de tres réplicas por tratamiento correspondientes a F_0 , F_v , F_m , T_m y F_v/F_m aportados por el fluorímetro.



Figura 5. Sistema de medida de fluorescencia de clorofila *a* en acículas de *P. radiata*.

Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos para la eficiencia del fotosistema II fue realizado con un ANOVA de dos vías. Se realizó el test LSD de Fisher para encontrar las diferencias entre los diferentes tratamientos y tiempos post-inoculación. El análisis se llevó a cabo mediante el software estadístico Infostat versión 2013.

Resultados

Pruebas de viabilidad de los microesclerocios

La viabilidad de los microesclerocios de *M. phaseolina* se evaluó sobre placas de medio APD y sobre raíces de plántulas a las 24 y 48 hpi (Figura 6). En medio APD (Figura 6A), el porcentaje de germinación de los microesclerocios fue del 83% a las 24 h y aumentó hasta un 93% a las 48 hpi. Las pruebas de viabilidad realizadas sobre raíces de plántulas (Figura 6B) mostraron que el porcentaje de germinación de los microesclerocios fue cercano al 36 % a las 24 h, mientras que aumentó hasta el 83 % a las 48 h

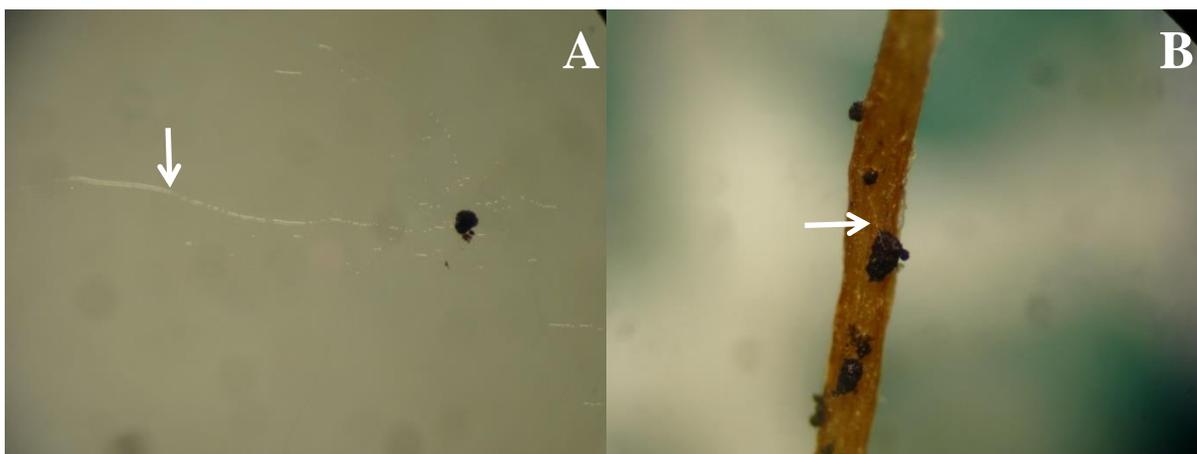


Figura 6. Pruebas de viabilidad de *M. phaseolina*. A) Microesclerocio germinado sobre APD y crecimiento de las hifas sobre la superficie del medio (flecha). B) Microesclerocio germinado creciendo sobre la superficie de la raíz de *P. radiata* (flecha).

Germinación de microesclerocios y crecimiento del patógeno

Se estudió mediante microscopía electrónica de barrido la evolución del proceso germinativo de los microesclerocios y el crecimiento de las hifas de *M. phaseolina* sobre la superficie de las raíces, así como el evento de penetración en los diferentes tiempos post-inoculación. El tamaño de los microesclerocios con los que se inocularon las raíces varió entre los 45 y 200 μm . Las plántulas control e inoculadas no mostraron ningún tipo de sintomatología provocada por el patógeno durante el tiempo que duró el ensayo. Transcurridas 6 hpi los microesclerocios permanecieron sin signos de germinación (Figura 7A). A las 12 hpi

unos pocos microesclerocios comenzaron a emitir los tubos germinativos a partir de los que se produjo el desarrollo y crecimiento de las hifas (Figura 7B). Transcurridas 24 hpi se observó un mayor número de microesclerocios germinados y un mayor tamaño en longitud de las hifas (Figura 7C). A las 36 hpi las hifas continuaron su crecimiento y se observó por primera vez el contacto de las hifas con la superficie de la raíz (foto no mostrada). La germinación fue vigorosa, con mayor número de hifas por microesclerocio a las 48 hpi, al igual que comenzó el crecimiento de las hifas sobre la superficie y, por tanto, la colonización de las misma (Figura 7D). En este tiempo también pudo observarse la adhesión de la hifa, la formación de una estructura de aspecto hinchado similar al apresorio, y se presume la penetración al interior de la raíz (Figura 7E y 7F).

Es a las 72 hpi cuando se observó un mayor número de microesclerocios germinados y una mayor colonización de la superficie radicular (Figura 8A), además de observarse numerosas estructuras parecidas a apresorios y puntos de penetración del patógeno (Figura 8B, 8C y 8D). También pudo observarse un agrupamiento de hifas sobre la superficie (Figura 8C). Por otra parte, las raíces empleadas como controles se encontraban sin la presencia del patógeno (Figura 8E y 8F). A la vista de los resultados, no existe un patrón de crecimiento definido de las hifas del hongo sobre la superficie de la raíz de las plántulas de *P. radiata* (Figura 8A).

En cuanto al tamaño de las hifas, este aumentó progresivamente a medida que transcurrió el tiempo tras la inoculación. A las 12 hpi las hifas tenían una longitud aproximada de 60-80 μm (Figura 7B) y a partir de las 36 hpi la longitud de estas hifas superó los 300 μm (Figura 7D, 8A).

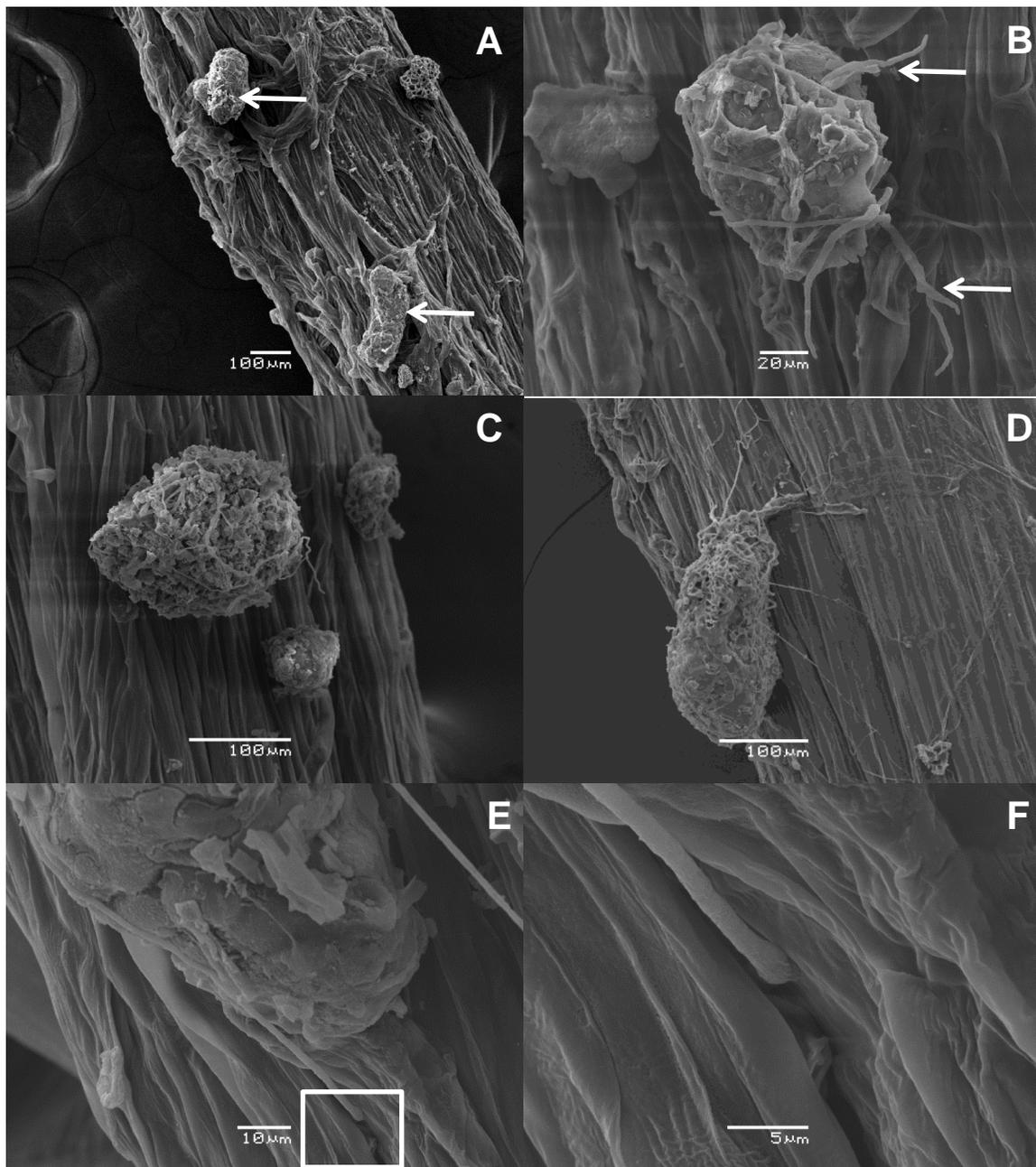


Figura 7. Interacción a las 6, 24, 36, 48 hpi. A) 6 hpi. con microesclerocios (flechas). B) 12 hpi. Microesclerocio con varios tubos germinativos emergentes (flechas). C) 24 hpi, las hifas continúan el crecimiento y tienen una mayor longitud. D) Hifas y contacto con la superficie a las 48 hpi. E) Hifa adherida las 48 hpi. F) Adhesión de la hifa, formación de una estructura similar a un apresorio y la penetración de la hifa a las 48 hpi.

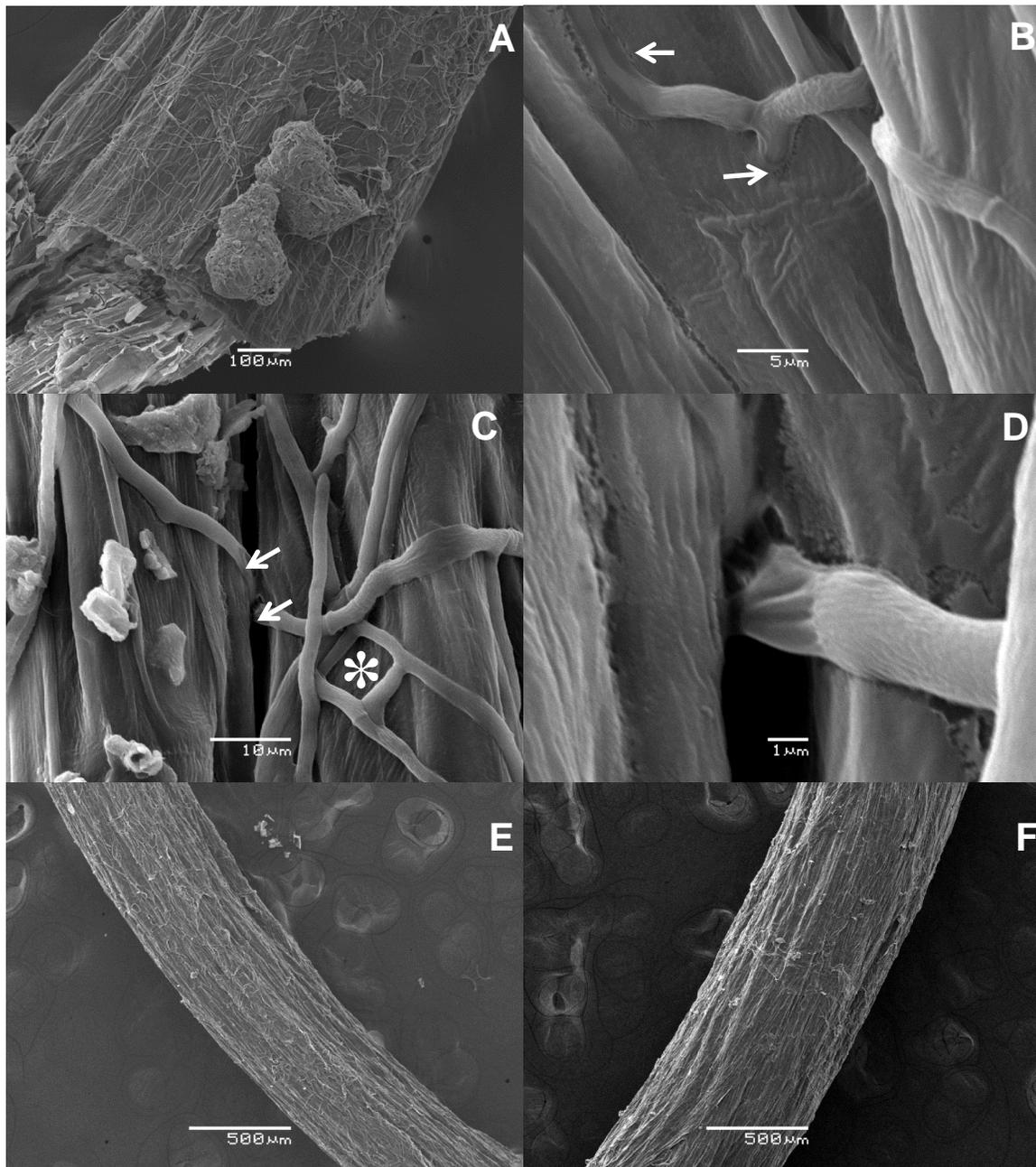


Figura 8. Crecimiento de *M. phaseolina* sobre la raíz de *P. radiata* a las 72 hpi. A) Superficie colonizada externamente por hifas de *M. phaseolina*. B) Varios puntos de penetración de una hifa (flechas). C) Penetración por aperturas naturales de la raíz (flechas): Agrupaciones de hifas que recuerdan a las fases iniciales de formación de microesclerocios (*) y varios puntos de penetración (flechas). D) Fase de formación de estructura similar al apresorio. E y F) Raíces control sin inóculo que no muestran signos.

Eficiencia del fotosistema II

En el anexo I muestra los parámetros F_0 y F_v/F_m para plántulas control e inoculadas hasta las 144 hpi. Estos parámetros son normalmente empleados como indicativos de estrés, los cuales permiten estimar la eficiencia del FSII. En las plántulas no inoculadas, el valor F_v/F_m se acercó al valor esperado 0,83 bajo condiciones normales. Las plántulas inoculadas mostraron una mayor variación en estos parámetros, especialmente transcurridas las 96 hpi donde se observó una tendencia creciente en el valor F_0 y una disminución en los valores para F_v/F_m .

Los valores de F_0 se mantienen invariables en las plántulas control, pero se observó una tendencia al aumento en las últimas horas tras la inoculación (Figura 9). El ANOVA de dos vías entregó un p-valor < 0.05 en el caso del tratamiento (Anexo II), no mostrando diferencias significativas debido al factor tiempo ni a la interacción de ambos factores (p-valor > 0.05).

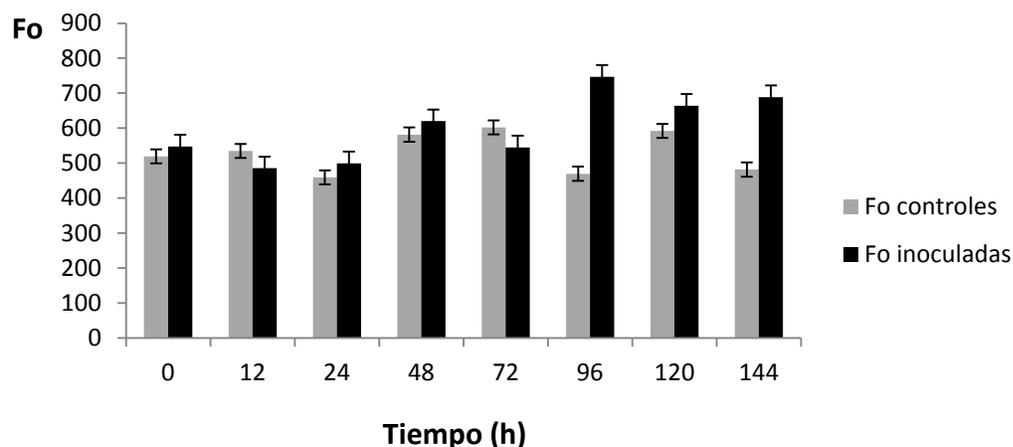


Figura 9. Gráfico de los valores medios de F_0 en plántulas de *P. radiata* control e inoculadas con *M. phaseolina* en los diferentes tiempos post-inoculación.

La representación gráfica de los valores F_v/F_m mostró una tendencia a la disminución a partir de las 120 y 144 hpi, aunque se observaron diferencias a las 96 hpi (Figura 10). El análisis estadístico de datos mediante ANOVA de dos vías para F_v/F_m entregó p-valor < 0.05 para ambos factores y para la interacción, indicando que existían diferencias significativas entre ambos tratamientos y que esto dependía del tiempo durante el cual estaban en contacto la

raíz y el patógeno. El test LSD de Fisher mostró que las diferencias significativas se concentraban en las plántulas control e inoculadas una vez transcurridas las 120 y 144 hpi (anexo III).

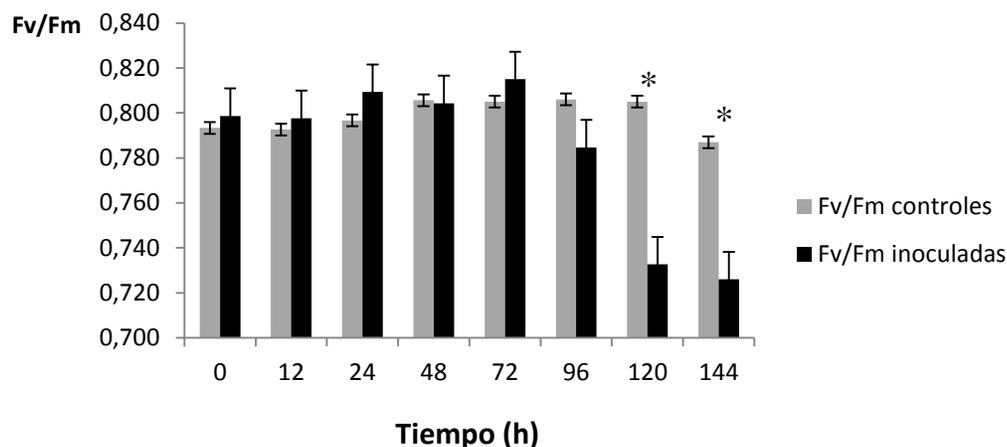


Figura 10. Gráfico que muestra los valores medios de F_v/F_m en plántulas de *P. radiata* control e inoculadas con *M. phaseolina* en los diferentes tiempos post-inoculación. *p-valor < 0.05

Discusión

Fue necesario llevar a cabo pruebas de viabilidad de los microesclerocios para conocer su supervivencia y capacidad germinativa bajo las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos a partir de estas pruebas muestran que más del 80% de los microesclerocios germinan antes de las 24 h y más del 90% de los microesclerocios lo hacen antes de las 48 h sobre medio APD. También fueron realizadas pruebas de viabilidad sobre raíces de plántulas de 20 días de edad para comprobar que la germinación también ocurre en estas condiciones de crecimiento *in vitro* obteniéndose valores de germinación de 36% a las 24h y 83% a las 48 h. Smith (1969) encontró valores similares de germinación sobre medio APD y Ayanru y Green (1973) encontraron un 72% de germinación de microesclerocios a las 15 h sobre medio APD. Por otro lado, Smith (1969) reveló que la germinación de los microesclerocios de *M. phaseolina* se veía afectada por exudados de las raíces de plántulas de 18 días de edad de *Pinus lambertiana*, siendo estos exudados radiculares fundamentales en la epidemiología de la enfermedad. En nuestros ensayos, las diferencias observadas en el porcentaje de germinación

de los microesclerocios a las 24 h y 48 h entre el ensayo de germinación sobre APD y sobre raíces de plántulas, podrían deberse al tiempo de difusión de las moléculas que actúan como factores estimulantes y activadores de la germinación, así como la concentración necesaria para que se produzca la activación. En las raíces de las plántulas, estos compuestos biológicos que actúan sobre la germinación de los microesclerocios y el crecimiento de las hifas tardarían más tiempo en difundir al exterior de la raíz y, por tanto, más tiempo en contactar con el patógeno y en alcanzarse la concentración necesaria de los mismos, algo que no ocurre con el medio APD, donde estos compuestos se encuentran más accesibles y en mayor concentración. Estas moléculas activadoras serían principalmente, azúcares y aminoácidos, aunque *M. phaseolina* parece responder a los aminoácidos pero no a los azúcares (Smith, 1969), a pesar de que Ayanru y Green, (1973) mostraron estimulación de la germinación mediante mezcla de aminoácidos y azúcares. Nelson (1991) reportó y confirmó que los aminoácidos de los exudados de las raíces actúan como estimulantes de la germinación de los esclerocios. Los datos obtenidos no serían extrapolables a experimentos desarrollados bajo condiciones naturales en campo, donde estarían influenciando numerosos factores como el crecimiento de la raíz dentro del suelo, el efecto de otros microorganismos de la rizosfera, entre otros.

Este trabajo es el primer reporte del estudio microscópico de la interacción de *M. phaseolina* con una especie de interés forestal. Se estudió la evolución de la interacción *P. radiata*-*M. phaseolina* desde el momento de la germinación de los microesclerocios la penetración de las hifas al interior de la raíz. Una vez transcurridas las 12 hpi se observó la germinación de algunos microesclerocios, que aumentó a las 24 hpi. Gaige *et al.* (2010), mediante microscopía óptica, observaron tiempos de germinación de los microesclerocios transcurrido 1 dpi sobre raíces de *M. truncatula*. Los resultados difieren de los obtenidos por Ammon *et al.* (1975), que mediante microscopía electrónica de scanning observaron la germinación de los microesclerocios a los 3 dpi sobre raíces de *G. max*. La germinación de los microesclerocios detectada por Chowdhury *et al.* (2014) comenzó una vez transcurridas las 24 h. Hasta las 48 hpi no comienza a observarse el crecimiento extensivo de las hifas sobre la superficie de la raíz sin un patrón de crecimiento definido, como identificaron anteriormente (Ammon *et al.* 1975) y las hifas tienden a penetrar en los surcos longitudinales de la raíz. Es en este tiempo post-inoculación donde se observan ya los primeros apresorios y puntos de

penetración de las hifas al interior de la raíz. Chowdhury *et al.* (2014) observó un comportamiento similar en la formación de estas estructuras. Es esperable que la penetración inicial de las hifas en la raíz, observadas en nuestro ensayo, sea a través de los espacios intercelulares, como reportó Ammon *et al.* (1974) mediante un estudio de microscopía electrónica de transmisión. Ammon *et al.* (1975) reportó que la penetración sería debida a presión mecánica y degradación química de la pared celular. A las 72 hpi ya existía una gran colonización de la superficie radicular y numerosos puntos de penetración de las hifas al interior. Se observaron diversos puntos de penetración de las hifas a través de aperturas naturales de la raíz, lo que coincide con lo reportado por Ammon *et al.* (1975). Esta colonización de la raíz fue posterior a la observada por Gaige *et al.* (2010), donde esta ya ocurría a los 2 dpi. La formación de microesclerocios sobre las raíces en los tiempos post-inoculación estudiados no ocurrió, como observaron anteriormente otros autores, Gaige *et al.* (2010), Chowdhury *et al.* (2014), aunque se observaron agrupamientos de hifas sobre la superficie de la raíz a las 72 hpi, lo que recuerda a las estructuras que comienzan a formarse anteriormente a la formación de los microesclerocios. En cuanto a la apariencia visual de las plantas, no se observaron síntomas; las plantas permanecieron con un aspecto saludable desde el momento de la inoculación hasta la toma de muestras. La causa probable de esto sería que la densidad de inóculo (DI) para que el patógeno cause enfermedad por medio de microesclerocios fuera demasiado baja, y que las condiciones de humedad y temperatura no fueran las óptimas. Solo existen algunos reportes de DI de este patógeno en invernadero y en campo, donde esta DI se sitúa en 25-1000 ufc/g y 50-250 ufc/g de suelo respectivamente (Gacitúa *et al.*, 2013). La temperatura y la humedad son considerados factores clave en el desarrollo de la enfermedad (Papavizas, 1977). Se puede estimar la velocidad de crecimiento y avance del patógeno sobre las raíces conociendo el tamaño aproximado de las hifas en cada tiempo. Debido a que a las 12 hpi el tamaño de las hifas era de 80 μm y a las 36 h mayor a 300 μm se puede decir que crece, al menos en las primeras etapas, a una velocidad aproximada de 200 μm cada 24 horas, siendo esta una de las principales causas de su gran virulencia. Aun así, se desconoce la velocidad de avance del patógeno por el interior de la raíz donde se ha visto que invaden y crecen por el haz vascular una vez transcurridas 72-74 hpi (Chowdhury *et al.*, 2014). Finalmente, en las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido se

observan diversos artefactos, principalmente grietas en la superficie de las raíces e hifas rotas, debidos posiblemente al proceso de fijación y deshidratación de las muestras para su observación, como ya reportaron otros autores (Ammon *et al.*, (1975).

Se estudió la variación en los parámetros de fluorescencia, F_0 y F_v/F_m , comúnmente empleados para evaluar fotoinhibición (Valladares y Percy, 1997), y por tanto, estrés en plantas. El valor F_v/F_m es una medida indirecta de la eficiencia del FSII como indicador del rendimiento fotosintético, con valores óptimos de 0,83, mientras que valores menores a este son indicativos de estrés. Por otro lado, aumentos en el valor F_0 indican daño inhibitorio por diversos tipos de estrés (entre ellos altas o bajas temperaturas, estrés hídrico, etc.) (Maxwell y Johnson 2000).

Los valores obtenidos tras la inoculación de plántulas de *P. radiata* con el patógeno de raíz *M. phaseolina* en F_0 están en un rango de valores promedio entre 459,33 y 747, y en F_v/F_m en un rango entre 0.726 y 0.815. Estos valores muestran una tendencia al incremento en el caso de F_0 y una tendencia a la disminución en el caso de F_v/F_m como muestran las representaciones gráficas, siendo más evidente en plántulas inoculadas durante las últimas hpi, con un mayor tiempo de interacción entre el patógeno y la raíz de la plántula. En todos los casos, plántulas control e inoculadas, los valores promedio de F_v/F_m estuvieron desde el inicio por debajo del valor normal 0,83 lo cual estaría informado de un estrés basal, estando este provocado por las condiciones de crecimiento *in vitro*, donde la planta se ve limitada básicamente de agua y nutrientes.

El análisis estadístico de los valores F_0 de las plántulas muestra diferencias significativas entre plántulas control e inoculadas, pero no por la duración de la interacción, al menos durante los tiempos ensayados. Se ha comprobado que el parámetro F_0 tienden a ser más alto en plantas inoculadas con patógenos (Maxwell y Johnson, 2000, Alonso *et al.*, 2011) y esa es la tendencia que muestran los datos obtenidos en esta investigación en los últimos tiempos post-inoculación. En el caso del parámetro F_v/F_m se observa una disminución de la eficiencia del FSII y fotoinhibición de la fotosíntesis, reflejadas en la disminución significativa de este parámetro a partir de las 120 hpi. Esto está en concordancia con los datos anteriormente obtenidos para infecciones por patógenos foliares como *Puccinia psidii* (Alonso

et al., 2011, Sebela *et al.*, 2012) y por otros patógenos de raíz como *Phytophthora cinnamomi* (Luque *et al.* 1999) o *Fusarium oxysporum* (Wagner *et al.*, 2006).

Murchie y Lawson (2013) postularon que, debido a que el valor F_v/F_m evalúa únicamente la eficiencia del FSII, el estrés que es provocado en cualquier otra parte de la planta como pueden ser las raíces, no se manifestaría como un cambio en el valor de F_v/F_m . Los resultados obtenidos mediante la inoculación *in vitro* de raíces de plántulas de *P. radiata* con el patógeno de suelo *M. phaseolina* rebate esta afirmación pues, como indica el análisis de datos, los parámetros de fluorescencia se ven modificados por la inducción de estrés a nivel de raíces, lo cual se evidencia en los valores F_v/F_m entre plántulas control e inoculadas en los últimos tiempos post-inoculación. La explicación a este hecho pasa por comprender que ocurre a nivel interno en la raíz tras la inoculación con el patógeno. Se sabe que el patógeno sigue su avance por el interior de esta, de forma que una vez que penetra la epidermis, pasa a través de los espacios intercelulares y finalmente invade las células (Ammon *et al.*, 1974). Entre las células objeto de invasión se encuentran las células xilemáticas del haz vascular que son ocupadas por hifas del hongo que crecen y obstruyen este tejido vascular (Chowdhury *et al.*, 2014); esto se traduciría finalmente en una incapacidad de transporte de agua de las raíces a las acículas y, por tanto, la aparición de estrés hídrico que estaría provocando cambios a nivel del aparato fotosintético. Este efecto provocado por el patógeno se haría más patente a medida que transcurre el tiempo de interacción entre el patógeno y la raíz. La medida de la fluorescencia de la clorofila *a* permitirá determinar en qué momento se produce la infección de una planta de forma precoz, sin necesidad de aislar el patógeno o detectar los síntomas.

Referencias bibliográficas

- Adomas, A., G. Heller, G. Li, K. Olson, T.M. Chu, J. Osborne, D. Craig, L. Van-Zyl, R. Wolfinger y Sederoff. (2007). Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiology* 27: 1441–1458.
- Alonso, A., L.M. Da Silva, A. Rodrigues, F. Murilo, y A. Couto. 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum*. DOI 10.1007/s11738-011-0722-z.
- Ammon, V., T.D. Wyllie y M.F. Brown. 1974. An structural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Physiological Plant Pathology* 4: 1-4.
- Ammon, V., T.D. Wyllie y M.F. Brown. 1975. Investigation of infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55: 77–81.
- Aynaru, D.K.G. y R.J. Green. 1973. Alteration of germination patterns of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* on soil surfaces. *Phytopathology* 64: 595-601.
- Bais, H. P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy y J.M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.
- Berger, S., Z. Benediktyová, K. Matou, K. Bonfig, M.J. Mueller, L. Nedbal, y T. Roitsch. 2007. Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797–806.
- Butin, H. y H.L. Peredo. 1986. Hongos parásitos en coníferas de América del sur con especial referencia a Chile. (J. Cramer, Berlin, Alemania). 100 p.

Chowdhury, S., A. Basu, T. R. Chaudhuri y S. Kundu. In-vitro characterization of the behaviour of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid at the rhizosphere and during early infection of roots of resistant and susceptible varieties of sesame. *European Journal of Plant Pathology* 138: 361–375.

Gacitúa Arias, S., R. Rubilar Pons y E. Sanfuentes Vonstowaser. 2013. Temporal analysis of charcoal root rot in forest nurseries under different pathogen inoculum densities and soil moisture content. *Tropical Plant Pathology* 38(3): 179-187.

Gaige, A.R., A. Ayella y B. Shuai. 2010. Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 412–418.

Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.

Hinojosa, J.C. 1997. Susceptibilidad de algunas especies forestales nativas chilenas a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Tesis. Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. 109 p.

IPCC. 2007. Climate change 2007: The physical science basis. In: Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L., eds. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC Secretariat.

IPCC. 2008. Climate change and water. In: Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Palutikof J., Wu S., eds. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC Secretariat, 210.

Kaur, S., G. Singh, S. Kaur, G.E. Vallad, R. Chand y V. Bahadur. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Crit. rev. Microbiology*: 1-16.

Kocal, N., U. Sonnewald, y S. Sonnewald. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during

compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology* 148: 1523–1536.

Luque, J., M. Cohen, R. Savé, C. Biel y I.F. Álvarez. 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence, and growth of *Quercus suber* L. *Annals of Forest Science* 56: 19-26.

McCain, A.H. y R.F. Scharpf. 1989. Effect of inoculum density of *Macrophomina phaseolina* on seedling susceptibility of six conifer species. *European Journal of Plant Pathology* 19: 119–123.

Maxwell, K., y G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.

Mazid, M., T.A. Khan, y F. Mohamma. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Issues In Biomedicine* 3: 232–249.

Meyer, W.A. y J.B. Sinclair. 1974. Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. *Phytopathology* 64: 845–849.

Muñoz, H. 2006. Análisis espacial de la enfermedad “pudrición carbonosa de la raíz” (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) en una plantación de *Pinus radiata* D. Don. Tesis. Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile. 25 p.

Nelson, E. B. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review Of Phytopathology* 42: 271–309.

Odjavakova, M., y C. Hadjiivanova. 2001. The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Phisiology* 27: 101–109.

Okubara, P.A. y T.C. Paulitz. 2005. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. *Plant and Soil* 274: 215-226.

Papavizas, G.C. 1977. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 337-341.

- Šebela, D., J. Olejníčková, A. Župčanová y R. Sotolař. 2012. Response of grapevine leaves to *Plasmopara viticola* infection by means of measurement of reflectance and fluorescence signals. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeli Anae Brunensis* 60: 229-238.
- Short, G.E., T.D. Wyllie y P.R. Bristow. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathology* 70: 13–17.
- Smith, W.H. 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. *The Journal of Microbiology* 15: 1387–1391.
- Smith, R.S., C.S. Hodges y C.E. Cordell. 1989. Charcoal root rot and black root rot: Forest nursery pest. In *Agriculture Handbook*, (U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., USA.): 112–113.
- Songa, W. y R.J. Hillocks. 1996. Legume hosts of *Macrophomina phaseolina* in Kenya and effect of crop species on soil inoculum level. *Journal of Phytopathology* 144: 387–391.
- Valladares, F. y R.W. Pearcy. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeres arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* 20: 25-36.
- Wagner, A., W. Michalek y A. Jamiolkowska. 2006. Chlorophyll fluorescence measurements as indicators of fusariosis severity in tomato plants. *Agronomy research* 4: 461-464.

Anexos

I. Resultados de valores medios de los parámetros de eficiencia del fotosistema II F_0 y F_v/F_m de plántulas control y plántulas inoculadas.

Tiempo (h)	Controles		Inoculadas	
	F_0	F_v/F_m	F_0	F_v/F_m
0	519,7	0,793	547,7	0,799
10	534,7	0,793	485,3	0,798
24	459,3	0,797	499,7	0,809
48	581,7	0,806	620,0	0,804
72	602,0	0,805	545,0	0,815
96	469,7	0,806	747,0	0,785
120	592,0	0,805	664,3	0,733
144	481,7	0,787	688,7	0,726

II. Resultados de ANOVA y Test LSD de Fisher para los valores F_0 de plántulas control e inoculadas en los diferentes tiempos post-inoculación Letras diferentes (A, B, C y D) indican diferencias significativas (p -valor < 0.05).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
F ₀	48	0,49	0,24	18,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	315523,15	15	21034,88	2,01	0,0475
Tratamiento	58171,69	1	58171,69	5,57	0,0246
Tiempo	113686,31	7	16240,90	1,55	0,1850
Tratamiento_Tiempo	143665,15	7	20523,59	1,96	0,0916
Error	334373,33	32	10449,17		
Total	649896,48	47			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=60,10727

Error: 10449,1667 gl: 32

Tratamiento Medias n E.E.

Control 530,08 24 20,87 A

Inoculada 599,71 24 20,87 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

III. Tabla ANOVA y Test LSD de Fisher para los valores F_v/F_m de plántulas control e inoculadas en los diferentes tiempos post-inoculación letras diferentes (A, B, C y D) indican diferencias significativas (p -valor < 0.05).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fv/Fm	48	0,79	0,70	1,94

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	15	1,9E-03	8,24	<0,0001
Tratamiento	2,8E-03	1	2,8E-03	11,98	0,0015
Tiempo	0,01	7	2,1E-03	8,85	<0,0001
Tratamiento_Tiempo	0,01	7	1,7E-03	7,09	<0,0001
Error	0,01	32	2,4E-04		
Total	0,04	47			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00905

Error: 0,0002 gl: 32

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Inoculada	0,78	24	3,1E-03	A
Control	0,80	24	3,1E-03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01809

Error: 0,0002 gl: 32

Tiempo	Medias	n	E.E.	
144h	0,76	6	0,01	A
120h	0,77	6	0,01	A
12h	0,80	6	0,01	B
96h	0,80	6	0,01	B
0h	0,80	6	0,01	B
24h	0,80	6	0,01	B
48h	0,81	6	0,01	B
72h	0,81	6	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,02559

Error: 0,0002 gl: 32

Tratamiento	Tiempo	Medias	n	E.E.	
Inoculada_144h		0,73	3	0,01	A
Inoculada_120h		0,73	3	0,01	A
Inoculada_96h		0,78	3	0,01	B
Control_144h		0,79	3	0,01	B
Control_12h		0,79	3	0,01	B C
Control_0h		0,79	3	0,01	B C
Control_24h		0,80	3	0,01	B C
Inoculada_12h		0,80	3	0,01	B C
Inoculada_0h		0,80	3	0,01	B C
Inoculada_48h		0,80	3	0,01	B C
Control_120h		0,81	3	0,01	B C
Control_72h		0,81	3	0,01	B C
Control_48h		0,81	3	0,01	B C
Control_96h		0,81	3	0,01	B C
Inoculada_24h		0,81	3	0,01	B C
Inoculada_72h		0,82	3	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Capítulo II: Respuesta transcripcional temprana de los genes *SCL* y *COMT* en raíces de plántulas de *Pinus radiata* infectadas con *Macrophomina phaseolina*.

Introducción

El estudio del transcriptoma permite conocer la expresión génica y como esta se regula frente a diferentes procesos como son el crecimiento y desarrollo, estrés abiótico o biótico, etc. Mediante el estudio de los ARNm pueden ser observadas diferencias entre individuos sanos y enfermos (Adams, 2008). En las interacciones planta-patógeno se observan variaciones en la expresión de genes que codifican para factores de transcripción y proteínas relacionadas con el metabolismo primario y secundario (van Verk *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012; Berger *et al.*, 2007; Bilgin *et al.*, 2010; Adomas *et al.*, 2007; Veluthakkal y Ghosh, 2010).

Entre las respuestas implicadas en defensa frente a patógenos a nivel molecular se encuentran la activación de factores de transcripción, codificados por genes ‘master switch’ (Singh *et al.*, 2012). Los ‘master switch’ son genes tempranos que controlan respuestas moleculares de tipo tardías implicadas en la defensa frente a microorganismos patógenos, además de participar en numerosos procesos, entre ellos en el desarrollo (Kaufmann *et al.*, 2010). Entre los factores de transcripción que participan más frecuentemente en las respuestas a patógenos se encuentran las familias WRKY, MYC MYB, BZIP y AP2/ERF (van Verk *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012). Otro factor de transcripción que se ha visto formando parte de la cadena de transducción frente al ataque por patógenos es el Scare Crow-Like Factor (SCL), además de participar en otros tipos de estrés y en el desarrollo radicular (Sánchez *et al.*, 2007; Gosal *et al.*, 2009). En *P. radiata* este factor de transcripción aumentó en las acículas de dos clones en respuesta a la inoculación con el patógeno necrotrofo *D. pinea* frente a los controles sometidos a daño mecánico (Frías, 2012).

El metabolismo primario comprende procesos relacionados, principalmente, con la fotosíntesis. Entre los genes afectados por el estrés biótico se encuentran principalmente, genes relacionados con la síntesis de pigmentos y el transporte de electrones. Los genes que codifican para proteínas del LHCII, centros de reacción del FSI y FSII, así como para la ATP

sintasa, redujeron su expresión tras el ataque por patógenos. El gen de la ferredoxina o la ferredoxina NADPH oxidorreductasa incrementaron su expresión (Bilgin *et al.*, (2010). En plántulas de *Pinus sylvestris* L. inoculadas con *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. también fueron reprimidos los genes relacionados con la fotosíntesis 15 hpi (Adomas *et al.*, (2007).

Los metabolitos secundarios (terpenos, fenoles, etc.) y las proteínas relacionadas con la patogénesis forman parte de respuestas tardías como defensa frente a microorganismos patógenos (Mazid *et al.*, 2011; Veluthakkal y Ghosh, 2010). La inducción del metabolismo secundario activa rutas relacionadas con la defensa a patógenos como el engrosamiento de la pared celular por deposiciones de lignina y calosa sobre la misma para impedir al avance y colonización del patógeno (Nicaise *et al.*, 2009; Zeyen *et al.*, 2002). *Eucalyptus gunni* Hook. acumula en sus paredes celulares lignina tras una herida o la presencia del patógeno (Hawkins y Boudet, 2003), siendo la Ácido Cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT) un enzima de la ruta biosintética de la lignina (Eckardt, 2002).

El transcriptoma de la especie *M. truncatula* ha sido estudiado utilizando como patógeno modelo a *M. phaseolina* (Mah *et al.*, 2012; Gaige *et al.*, 2010). Fueron identificados genes de auxinas (*PIN*, *LAX5*, etc.) relacionados con la tolerancia a la enfermedad de la podredumbre carbonosa (Mah *et al.*, (2012). Por otro lado, han sido estudiados genes de biosíntesis de metabolitos secundarios, así como de proteínas PR, después de conocer los eventos del proceso infectivo. Las proteínas PR-5 aumentaron su expresión transcurridas las 24 y 48 hpi, de igual forma que lo hicieron las proteínas relacionadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Gaige *et al.*, (2010).

El objetivo de este estudio fue conocer como varió la expresión de los genes *SCL* y *COMT* luego de inocular tejido radicular de *P. radiata* con *M. phaseolina*.

Material y Métodos

Material vegetal

Esterilización previa de la superficie de las semillas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 15 minutos y enjuagado tres veces con agua destilada estéril durante 10 minutos.

Posteriormente, las semillas fueron embebidas en agua durante 24 horas y otras 24 horas en una solución de giberelinas (GA_3) a una concentración de 300 mg/L. Una mezcla de semillas de *P. radiata* fueron germinadas siguiendo el método descrito previamente por Adomas *et al.* (2007) modificado: esterilización previa de la superficie de las semillas con peróxido de hidrógeno al 30% durante 15 minutos y enjuagado tres veces con agua destilada estéril durante 10 minutos. Se sembraron en medio agar agua al 1%. Se incubaron posteriormente a 20°C en oscuridad hasta la germinación. Las plántulas fueron transferidas a cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 horas y temperatura de 25° C hasta los 25 días de edad.

Patógeno y producción de inóculo

La cepa de *M. phaseolina* que se empleó en la inoculación se aisló a partir de suelos donde estaba presente *P. radiata*. *M. phaseolina* se creció en medio semisólido de agar-patata-dextrosa (APD) a una temperatura de 25° C. Los microesclerocios fueron producidos en matraces con caldo-patata-dextrosa (CPD) a partir de discos de micelio durante 21 días en oscuridad a una temperatura de 31° C. Posteriormente, se secaron y tamizaron entre 45 y 200 μm .

La viabilidad se realizó sobre medio APD depositando microesclerocios individuales sobre el medio y sobre raíces de plántulas de *P. radiata*, y en ambos casos fueron incubadas a 25° C. Se calculó la viabilidad de los microesclerocios como porcentaje de germinación de 30 microesclerocios en medio APD y de 20 microesclerocios sobre la superficie de las raíces de las plántulas por medio de lupa binocular.

Método de inoculación

El procedimiento de inoculación fue el siguiente: las raíces de las plántulas de 25 días de edad se sumergieron en carboximetilcelulosa (CMC) al 1%, se transfirieron a una placa de Petri con papel filtro húmedo estéril y se inocularon a lo largo de 1 cm a partir del ápice, depositando 10 microesclerocios sobre cada raíz. Las plántulas control fueron únicamente sumergidas en CMC al 1%. La zona de las raíces se cubrió con papel de aluminio. A continuación, se incubaron las plántulas a 25° C hasta la toma de muestras.

Evaluación de la expresión génica

El ARN de las diferentes muestras se extrajo por el método CTAB 2% descrito por Chang et al., (1993) optimizado anteriormente para material vegetal procedente de pino, excepto las muestras C2 e I3 que fueron extraídas con kit NucleoSpin[®] RNA isolation from plant (Macherey-Nagel). El ARN se extrajo de controles (dos réplicas biológicas) e inoculadas (tres réplicas biológicas) en los tiempos de muestreo de 12, 24, 48 y 72 hpi usando el método descrito por Chang et al. (1993) modificado, y su integridad se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. Las muestras fueron tratadas con rDNasa (Macherey-Nagel), siendo valorada de nuevo su integridad en gel de agarosa 1.5%. El ARN fue purificado usando el kit NucleoSpin[®] RNA Cleanup (Macherey-Nagel). Finalmente, se cuantificó la cantidad de ARN con fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen[®]).

La síntesis de la hebra simple de ADNc (ADNc-hs) se realizó a partir de 2 µg de ARN empleando un olido-d(T)₂₃VN (New England Biolab[®]). Se comprobó la integridad del ADNc-hs mediante gel de agarosa 1,5 % y se cuantificó con Qubit 2.0 fluorómetro (Invitrogen[®]).

Previo a la realización de RT-PCR se necesitaba conocer al menos un gen que se esté expresando constitutivamente bajo las condiciones y tiempos ensayados. Para ello fueron evaluados los genes de actina y 18S en algunas de las réplicas de los tiempos 12, 24 y 72 hpi.

Se realizó RT-PCR semicuantitativa a partir de ADNc-hs para los genes *COMT* y el factor de transcripción *SCL*, en los diferentes tiempos post-inoculación de 12, 24, 48 y 72 hpi. Como gen de expresión constitutiva se empleó el gen 18S tras hacer la validación junto con el gen de actina. Los primers empleados para cada gen de *P. radiata* se indican en la Tabla 1 (Sánchez *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2014). El programa de PCR empleado fue el siguiente: denaturación inicial a 95°C durante 30 s seguido de 30 ciclos: denaturación (95°C, 30 s), hibridación (60°C, 30s), extensión (72°C, 30 s), y extensión final a 72°C durante 7 min.

Tabla 1. Primers de genes COMT, SCL, 18S y actina.

Gen	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	Tamaño amplicón (pb)	GenBank accesion
COMT	GAAATACCAAGGCTTCCACT	ACATGAGGGAGGTCGTAGTT	106	AF119225
SCL	TCAATCTCTGGCAAATCGTCC	GCGCCCAGTCTCTTCAATCT	108	DQ683567
18S	CATCGAGTCTGGTAATTGGA	ACGAGCTTTTAACTGCAACA	110	M82461
Actina	AACTTTCAATGTGCCTGCTA	AGCTTCCATCCCAATTAAAG	547	EU301693

Análisis de datos

La expresión relativa de los genes COMT, SCL y 18S para los diferentes tiempos post-inoculación fue calculada usando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

Resultados

Extracción de ARN y síntesis de ADNc-hs

En todas las muestras aparecieron bandas de alto peso molecular correspondientes a ADN genómico. Por otro lado, se observó que en todas las muestras estaban presentes las dos bandas de ARN (Figura 11), con smear de degradación, correspondientes a ARNr 28S y 18S, excepto en las muestras C2 e I3 del tiempo 48 hpi donde el ARN estaba degradado, a pesar de que se observaron dos bandas levemente marcadas en la muestra I3 del tiempo 48 hpi.

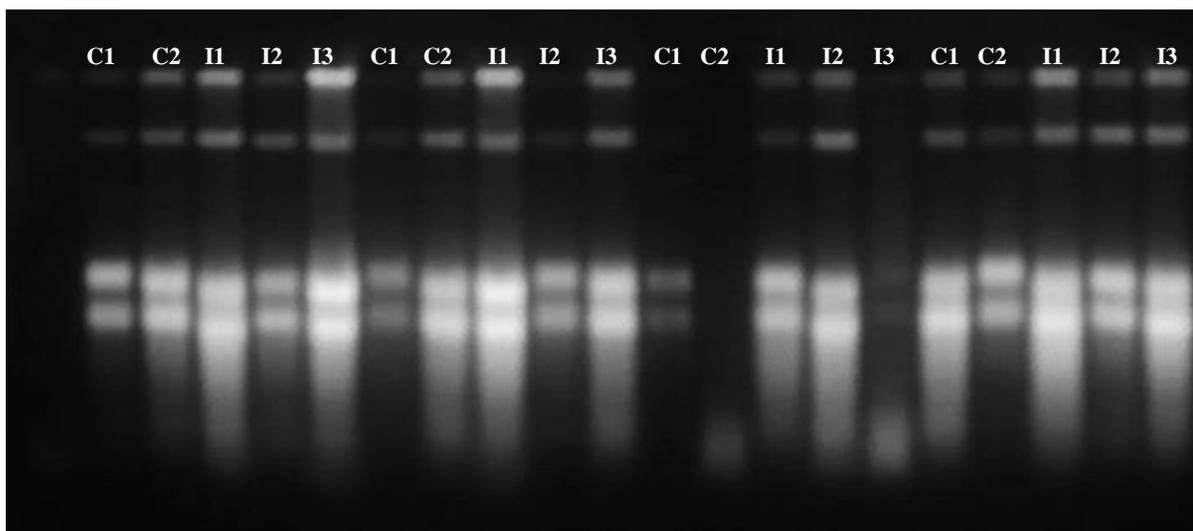


Figura 11. Integridad de las 20 muestras de ARN de 20 muestras en gel de agarosa 1,5% donde se muestran las réplicas de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24, 48 y 72 hpi. 1 Kb: marcador de peso molecular. Condiciones de electroforesis: 65 V, 45 min. Carga de 5 μ L muestra y 1 μ L buffer de carga 6X.

En la Figura 12 se muestran los resultados de integridad de las 20 muestras de ARN en los tiempos de 12, 24, 48 y 72 h post-inoculación tras el tratamiento con rDNasa. Se observó la integridad de 18 de las 20 muestras totales, debido a que como se observó anteriormente (Figura 13) con las muestras C2 e I3 del tiempo 48 hpi se intentó la extracción de ARN con el kit NucleoSpin[®] RNA isolation from plant (Macherey-Nagel), demostrando que el método CTAB 2% descrito anteriormente por Chang et al., (1993) y optimizado para el pino es el mejor método de extracción de ARN. En todas las muestras se observó también un smear de degradación de ARN pero las bandas correspondientes al ARNr 28S y 18S se observaron de forma clara indicando la integridad del ARNm. Las muestras C2 e I3 del tiempo 48 hpi fueron a partir de este momento excluidas de los análisis por no contener ARN íntegro. La concentración de ARN fue medida con fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen[®]) y los datos correspondientes aparecen tabulados en la Tabla 2. El rango de concentraciones de ARN varía entre 0,16 y 0,93 μ g/ μ L, las muestras C2 e I3 (48 hpi) mostraron concentraciones por debajo de los 0,05 μ g/ μ L.

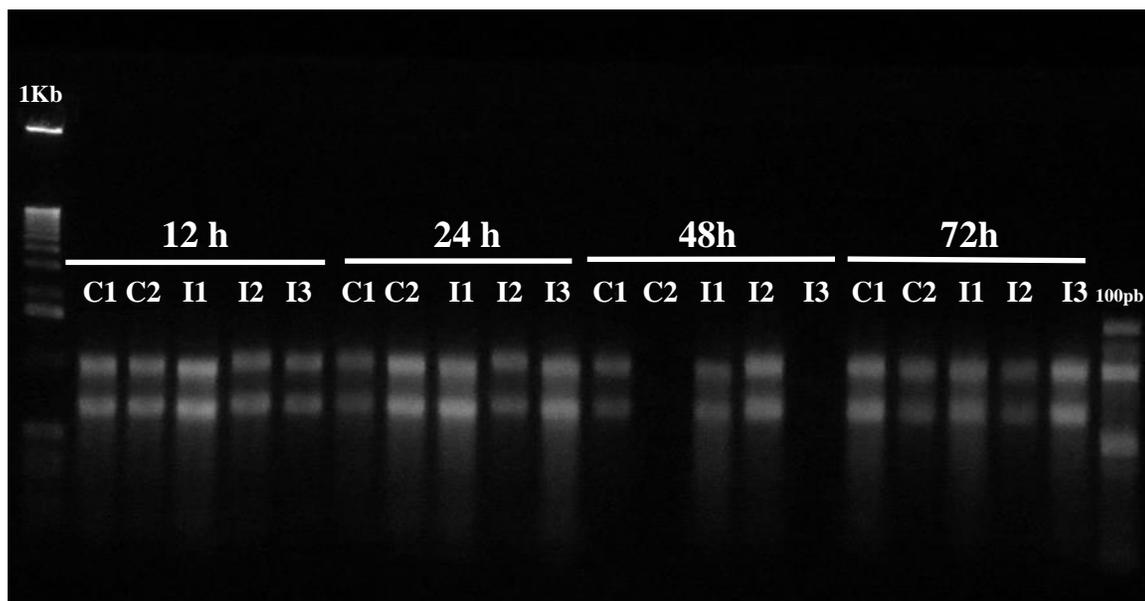


Figura 12. Prueba de integridad del ARN de 20 muestras en gel de agarosa 1,5% donde se muestran las réplicas de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24, 48 y 72 hpi tras el tratamiento con rDNasa. 1Kb y 100 pb: marcadores de peso molecular. Condiciones de electroforesis: 65 V, 45 min. Carga de 5 μ L muestra y 1 μ L buffer de carga 6X.

Tabla 2. Concentración de ARN de las 20 muestras correspondientes a plántulas control (C) e inoculadas (I) de *P. radiata* en los diferentes tiempos post-inoculación.

	12 h					24 h					48 h					72 h				
	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3
[ARN] μ g/ μ L	0,38	0,38	0,58	0,25	0,5	0,18	0,49	0,52	0,19	0,45	0,16	<0,05	0,22	0,44	<0,05	0,68	0,93	0,49	0,21	0,46

La integridad del ADNc-hs se valoró mediante gel de agarosa 1,5% en algunas de las muestras de ARN, observándose un smear en todas las muestras por debajo de los 1000 pb (Figura 13). Además, no se observaron las bandas correspondientes al ARN. La concentración de ADNc-hs se midió con fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen®) y los datos se tabularon en la Tabla 3, observándose que el rango de concentraciones del ADNc-hs varió entre 28,4 y 32,6 ng/ μ L. Con estos datos se concluyó que hubo una eficiencia en la transformación de ARN y

ADNc-hs generándose cantidades equivalentes de ADNc-hs a pesar de las diferentes concentraciones de ARN de partida.

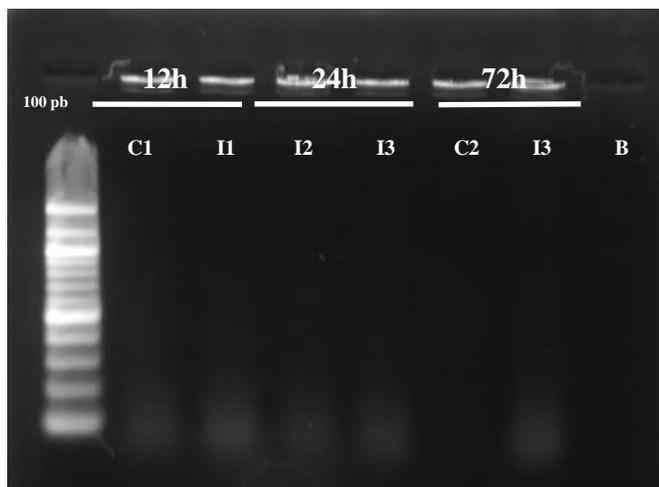


Figura 13. Integridad de ADNc-hs en gel de agarosa 1,5% de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24 y 72 hpi. 100 pb: marcador de peso molecular. B: blanco. Condiciones de electroforesis: 65 V, 45 min. Carga de 5 μ L muestra y 1 μ L buffer de carga 6X.

Tabla 3. Concentración de ADNc-hs de las 18 muestras correspondientes a plántulas control (C) e inoculadas (I) en los diferentes tiempos post-inoculación.

	12 h					24 h					48 h					72 h				
	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3	C1	C2	I1	I2	I3
[ADNchs] ng/ μ L	32,8	30,4	29,4	29,2	31,4	29	31,8	29,8	29	30	29		31	28,8		32,6	25,4	29	31,2	28,4

Evaluación de la expresión de genes candidatos

Los resultados correspondientes a la amplificación se muestran en la Figura 14. Estos resultados demostraron que la actina se expresó de igual forma a las 12 hpi en controles e inoculadas, mientras que a las 24 y 72 hpi, su expresión era variable dependiendo del tratamiento y del tiempo que estuvieron en contacto la raíz y el patógeno. Por su parte, el gen

del ARNr 18S se expresó tanto en controles como en inoculadas en los diferentes tiempos post-inoculación, mostrando además una intensidad homogénea de todas las bandas. Las muestras control (B) no mostraron amplificación. Abajo del gel aparecieron bandas correspondientes a los primers. Estos datos muestran que el 18S puede ser empleado como gen de expresión constitutiva tanto en plántulas control como inoculadas, y en todos los tiempos post-inoculación.

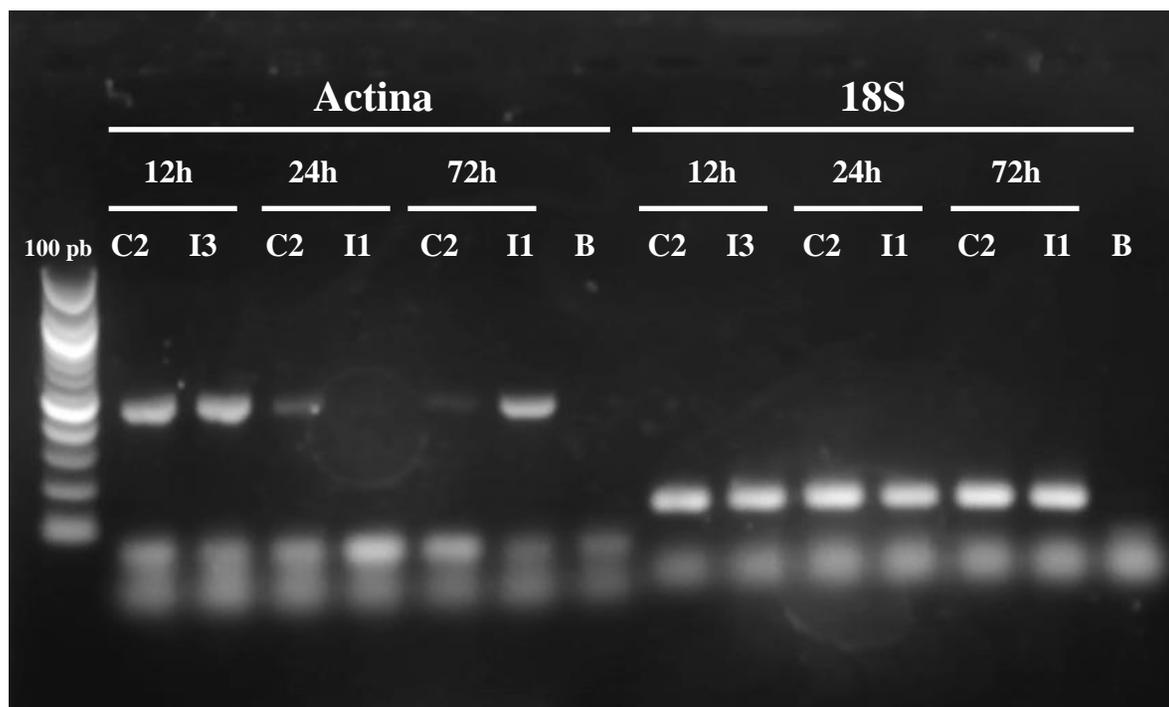


Figura 14. Prueba de expresión constitutiva de genes actina y 18S de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* sobre gel de agarosa 1,5%. Condiciones de electroforesis: 65 V, 45 min. Carga de 2 μ L muestra, 3 μ L de H₂O y 1 μ L buffer de carga 6X.

La Figura 15 corresponde a la expresión constitutiva del gen para el ARNr 18S, se observó la expresión en todos los tiempos ensayados y tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas. En cuanto a la intensidad de banda esta es mayor en I1 e I2 (12 hpi), y una menor intensidad en C2 (24 hpi). Por otra parte, el tamaño de banda (entre 100 y 200 pb) se correspondió con el tamaño de amplicón esperado mediante la utilización de los primers citados anteriormente en la metodología. En la parte inferior del gel se observaban los primers. La muestra empleada como blanco (B) no mostró amplificación.

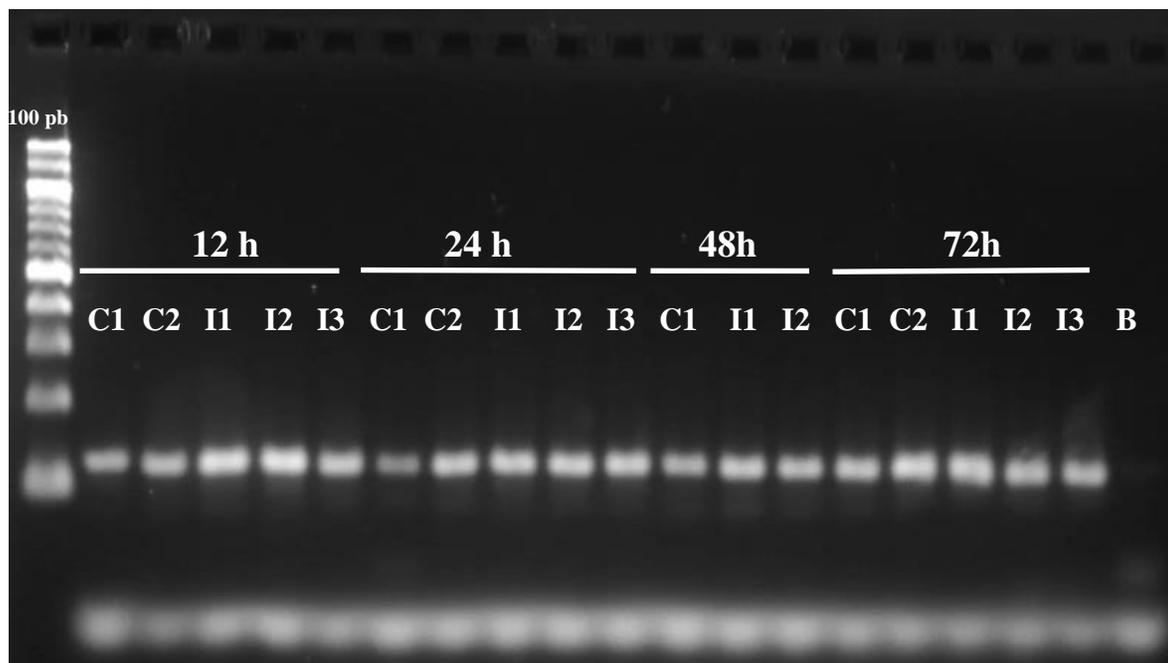


Figura 15. Expresión de ARNr 18S de *P. radiata* en las 18 muestras en gel de agarosa 2% donde se muestran las réplicas de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24, 48 y 72 hpi. Condiciones de electroforesis: 60 V, 55 min. Cargados 2 μ L de muestra, 3 μ L de agua y 1 μ L de buffer 6X.

Una vez que se conoció el gen de expresión constitutiva, se procedió al estudio de expresión de los genes *COMT* y *SCL* para las 18 muestras en los diferentes tiempos post-inoculación. Se realizaron las amplificaciones y se obtuvieron los geles de agarosa 2% para los genes de ARNr (Figura 15), *COMT* (Figura 16) y *SCL* (Figura 17).

El gen *COMT* se expresó en las 18 muestras, tanto en plántulas control como inoculadas, y mostró un patrón de expresión variable entre tratamientos o tiempos post-inoculación, ya que la intensidad de banda mostraba una gran variación entre las réplicas biológicas dentro de un mismo tiempo post-inoculación (Figura 16). Las muestras que presentaron una mayor intensidad de banda, y por ende una mayor expresión fueron C2, I2 e I3 (12 hpi), mientras que las que tuvieron menor expresión fueron I2 e I3 (72 hpi). El blanco

no mostró amplificación. En la parte inferior del gel se observaban las bandas correspondientes a primers (bandas inferiores) y dímeros de primers (bandas superiores).

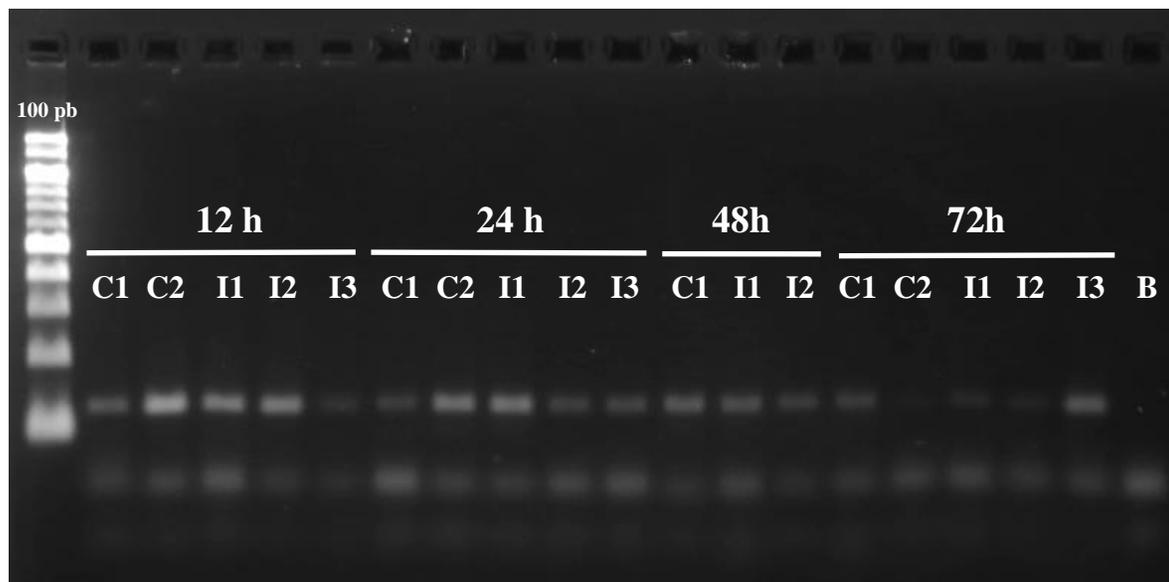


Figura 16. Expresión del gen COMT de *P. radiata* en las 18 muestras en gel de agarosa 2% donde se muestran las réplicas de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24, 48 y 72 hpi. Condiciones de electroforesis: 60 V, 55 min. Cargados 2 μ L de muestra, 3 μ L de agua y 1 μ L de buffer 6X.

En la Figura 17 aparece representada la expresión del gen que codifica para el factor de transcripción SCL. Pudo observarse la expresión del mismo en todas las muestras pero con variaciones en las intensidades de las bandas, aunque tampoco se observó un patrón de expresión influenciado por la inoculación del patógeno, ya que algunas bandas control mostraron una mayor intensidad que las bandas inoculadas en los últimos tiempos post-inoculación. Las muestras que presentaron una mayor expresión fueron I1 (12 hpi), I3 (24 hpi), I1 (48 hpi) y C2 (72 hpi), mientras que donde se expresaron menos son las muestras C1 y C2 (24 hpi). Para visualizar la expresión de este gen fue necesario cargar 5 μ L de muestra, a diferencia de los genes ARNr 18S y COMT donde la expresión se observaba con únicamente 2 μ L de muestra. El blanco no mostró amplificación. En la parte inferior del gel se observaban las bandas correspondientes a primers (bandas inferiores) y dímeros de primers (bandas superiores)

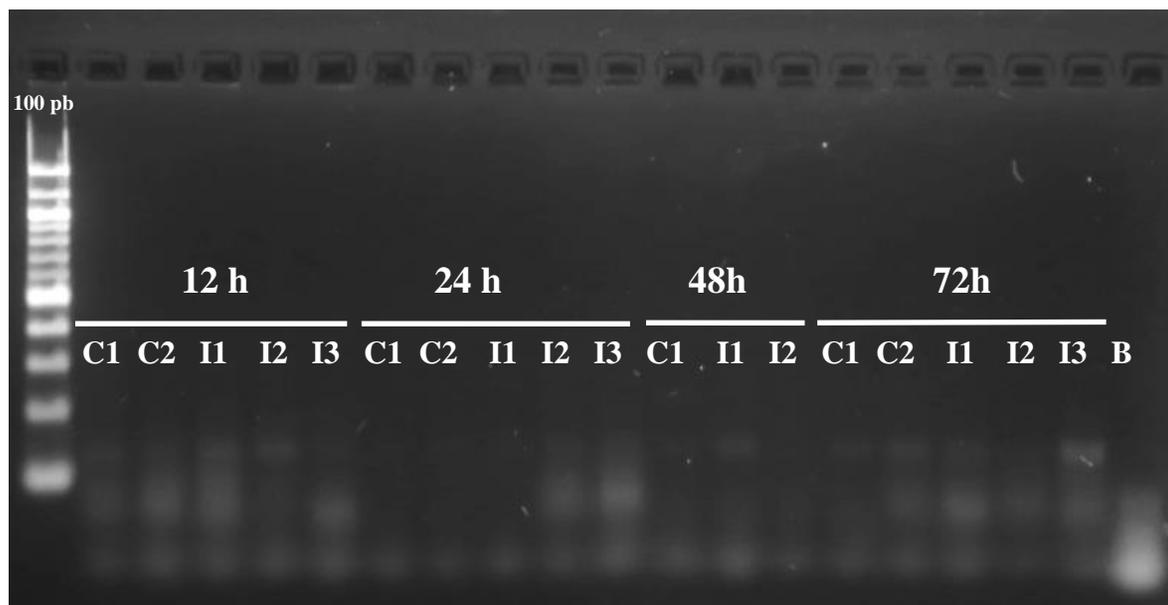


Figura 17. Expresión del gen SCL de *P. radiata* en las 18 muestras en gel de agarosa 2% donde se muestran las réplicas de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* a las 12, 24, 48 y 72 hpi. Condiciones de electroforesis: 60 V, 55 min. Cargados 5 μ L de muestra y 1 μ L de buffer 6X.

A partir de los geles de agarosa 2% se cuantificó la expresión relativa de los genes ARNr 18S, COMT y SCL (anexos I, II, III). A la vista de los datos representados gráficamente en la Figura 20 se observó una gran variabilidad en la expresión relativa del gen COMT. Entre las plántulas control e inoculadas a las 12 y 24 hpi no se observaron variaciones destacables para la expresión relativa de estos genes respecto al gen 18S. Una vez transcurridas 48 hpi se observó una ligera disminución de la expresión en el gen COMT en plántulas inoculadas respecto a las plántulas control, pero este patrón no se mantuvo a las 72 hpi, sino que en este tiempo la expresión relativa volvió a hacerse de nuevo variable. La observación global de los datos permitió advertir una leve tendencia a la disminución en la expresión relativa del gen COMT tanto en plántulas control como en plántulas inoculadas.

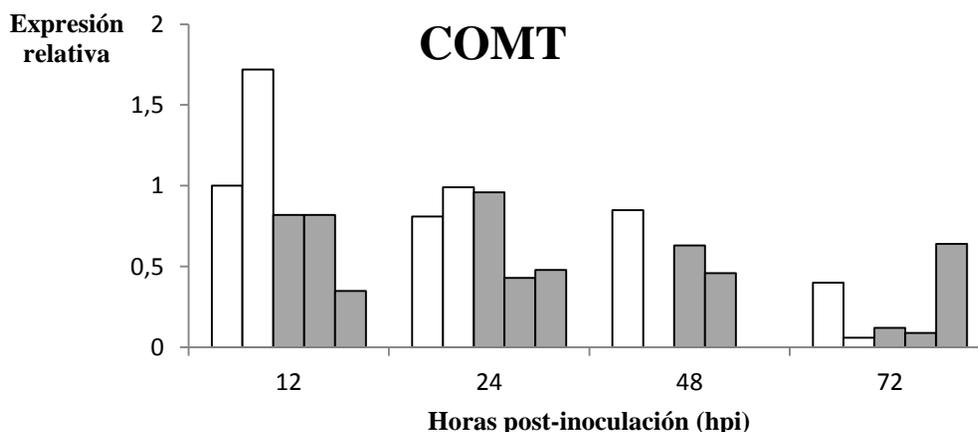


Figura 20. Expresión relativa de gen COMT en las 18 muestras de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* en los diferentes tiempos post-inoculación.

El gen que codifica para el factor de transcripción SCL se expresa en todas las réplicas de plántulas control e inoculadas y nuevamente se observa una gran variabilidad en la expresión relativa del mismo (Figura 21). A las 12 hpi la expresión relativa entre plántulas control e inoculadas no muestra grandes variaciones, a las 24 hpi las plántulas inoculadas estarían expresando este gen en mayor medida que las plántulas control, tendencia que se pierde a las 48 hpi y 72 hpi. Al contrario de lo que ocurría con el gen COMT, no se observa una tendencia ni hacia el aumento ni hacia la disminución de su expresión relativa.

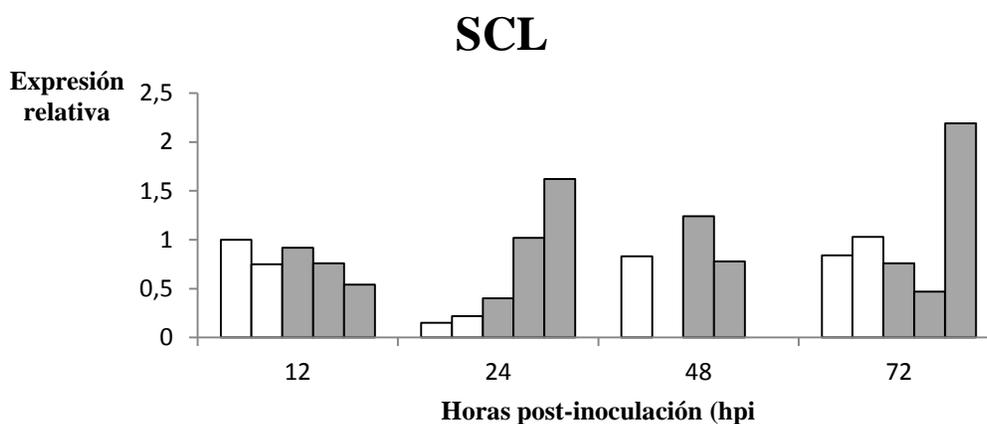


Figura 21. Expresión relativa del factor de transcripción SCL en las 18 muestras de plántulas de *P. radiata* control (C) e inoculadas (I) con *M. phaseolina* en los diferentes tiempos post-inoculación.

Discusión

Se estudió la expresión de los genes *COMT* y *SCL* a lo largo de las 72 hpi, anteriormente reportados como genes participantes en respuestas defensivas frente a patógenos de plantas (Hawkins y Boudet, 2003, Frías, 2012). Se empleó como gen de expresión constitutiva el gen de ARNr 18S. Cabe destacar la asunción de que realmente este es un gen de expresión constitutiva ya que si bien en la prueba inicial frente al gen de actina la intensidad de banda entre las diferentes muestras era muy homogénea, cuando se realizó el gel de agarosa en todas las muestras se observaron variaciones en la intensidad de banda entre los diferentes tratamientos, lo cual podría indicar que aunque se esté expresando bajos todas las condiciones ensayadas, puede no ser el mejor gen representante de expresión constitutiva. A la vista de los resultados, para el gen de la ruta de biosíntesis de lignina se observa una tendencia decreciente a la expresión del gen, si bien no se pueden sacar conclusiones acerca de la expresión diferencial del gen entre las plántulas control e inoculadas una vez se ha producido la penetración del patógeno, es decir, a partir de las 48 hpi, ya que los datos muestran una gran variabilidad en la expresión relativa. Por lo tanto, lo anteriormente reportado por Hawkins y Boudet, (2003) y Freeman *et al.*, (2014) no se cumple para este gen y en los tiempos ensayados para *P. radiata* inoculado con *M. phaseolina*. En cuanto a la expresión del gen *SCL* existe también una gran variación en la expresión relativa entre plántulas control e inoculadas en los diferentes tiempos post-inoculación. Este gen había sido reportado como participante en la defensa de *P. radiata* frente al patógeno necrotrofo *D. pinea* (Frías, 2012), siendo por tanto un firme candidato a la expresión diferencial entre controles e inoculadas. Los resultados obtenidos permiten visualizar que este factor de transcripción no está relacionado con la activación de respuestas de defensa tempranas, al menos bajo las condiciones y tiempos post-inoculación ensayados. En los resultados obtenidos podemos concluir que la expresión del gen *SCL* se debe básicamente a su contribución en procesos celulares como el mantenimiento de meristemas, el desarrollo radicular, etc. (Bolle, 2004).

Referencias bibliográficas

- Adams, J. (2008). Transcriptome: connecting the genome to gene function. *Nature Education* 1.
- Adomas, A., Heller, G., Li, G., Olson, K., Chu, T.-M., Osborne, J., Craig, D., Van-Zyl, L., Wolfinger, R. y Sederoff, R. (2007). Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiol.* 27, 1441–1458.
- Berger, S., Sinha, A.K. y Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J.Exp. Bot.* 58, 4019–4026.
- Bilgin, D.D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R. y DeLucia, E.H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell Environ.* 33, 1597–1613.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683–692.
- Gaige, A.R., Ayella, A. y Shuai, B. (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 412–418.
- Jøhnk, N., Hietala, A.M., Fossdal, C.G., Collinge, D.B. y Newman, M.-A. (2005). Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). *Tree Physiol* 25, 1533–1543.
- Kaufmann, K., Pajoro, A. y Angenent, G.C. (2010). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches.
- Khong, G., Richaud, F., Coudert, Y., Pati, P.K., Santi, C., Périn, C., Breitler, J.-C., Meynard, D., Vinh, D.N., Guiderdoni, E., et al. (2008). Modulating rice stress tolerance by transcription factors. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25, 381–403.
- Mah, K.M., Uppalapati, S.R., Tang, Y., Allen, S., y Shuai, B. (2012). Gene expression profiling of *Macrophomina phaseolina* infected *Medicago truncatula* roots reveals a role for auxin in plant tolerance against the charcoal rot pathogen. *Physiology Molecular Plant Pathology* 79, 21–30.

- Quentin, M., Allasia, V., Pegard, A., Allais, F., Ducrot, P.-H., Favery, B., Levis, C., Martinet, S., Masur, C., Ponchet, M., et al. (2009). Imbalanced Lignin Biosynthesis Promotes the Sexual Reproduction of Homothallic Oomycete Pathogens. *PLoS Pathogen* 5, e1000264.
- Schäfer, H., y Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* 4, 1684–1703.
- Singh, K.B., Foley, R.C., y Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 430–436.
- Singh, P., Bawankar, R., Gothandam, K.M., Subashkumar, R., Vivekanandhan, G., Thayumanvan, T., y Babu, S. (2012). “Master switch” genes for disease resistance in rice: lessons learnt and lessons to learn. *Research in Biotechnology* 3.
- Van Verk, M.C., Gatz, C., y Linthorst, H.J.M. (2009). Chapter 10 Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses. In *Advances in Botanical Research*, L.C. Van Loon, ed. (Academic Press), pp. 397–438.
- Veluthakkal, R. y Ghosh, M. (2010). Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. *Trees*, 14 p.
- Zhang, Y. y Wang, L. (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol.* 5, 1.

Anexos

I. Cálculo de la expresión relativa del gen de *ARNr 18S*.

18S	Muestras	Área	Factor corrección
12 hpi	C1	21.680.619	1
	C2	26.822.619	0,81
	I1	40.396.104	0,54
	I2	38.961.397	0,56
	I3	29.350.033	0,74
24 hpi	C1	16.743.033	1,29
	C2	29.533.276	0,73
	I1	31.593.983	0,69
	I2	31.620.740	0,69
	I3	31.025.447	0,70
48 hpi	C1	24.056.861	0,90
	C2	0	0,00
	I1	29.296.104	0,74
	I2	25.568.397	0,85
	I3	0	0,00
72 hpi	C1	28.373.104	0,76
	C2	34.181.225	0,63
	I1	34.610.569	0,63
	I2	28.340.861	0,76
	I3	24.825.447	0,87

II. Cálculo de la expresión relativa del gen *COMT*.

COMT	Muestra	Área	A. corregida	Expresión relativa
12 hpi	C1	17.507.083	17.507.083	1
	C2	37.243.983	30.104.167,1	1,72
	I1	26.607.861	14.280.458,7	0,82
	I2	25.699.447	14.300.819,8	0,82
	I3	8.259.912	6.101.526,53	0,35
24 hpi	C1	10.885.154	14.095.228,5	0,81
	C2	23.636.447	17.351.708,7	0,99
	I1	24.614.569	16.891.162,2	0,96
	I2	11.009.205	7.548.412,18	0,43
	I3	12.148.861	8.489.638,41	0,48
48 hpi	C1	16.586.326	14.947.994	0,85
	C2	0	0	0,00
	I1	15.014.276	11.111.334	0,63
	I2	9.508.326	8.062.546,64	0,46
	I3	0	0	0,00
72 hpi	C1	9.252.569	7.070.126,1	0,40
	C2	1.714.962	1.087.773,7	0,06
	I1	3.401.205	2.130.569,7	0,12
	I2	2.088.548	1.597.728,93	0,09
	I3	12.830.790	11.205.416,3	0,64

III. Cálculo de la expresión relativa del gen *SCL*.

SCL	Muestra	Área	A. corregida	Expresión relativa
12 hpi	C1	13230497	13230497	1
	C2	12198912	9860333,3	0,75
	I1	22569276	12112947,2	0,92
	I2	18185447	10119548,5	0,76
	I3	9620690	7106721,63	0,54
24 hpi	C1	1574790	2039201,74	0,15
	C2	3947033	2897549,15	0,22
	I1	7734205	5307414,13	0,40
	I2	19618861	13451584,3	1,02
	I3	30652347	21419896,3	1,62
48 hpi	C1	12244255	11034815,7	0,83
	C2	0	0	0,00
	I1	22254640	16469574,6	1,24
	I2	12106740	10265861,3	0,78
	I3	0	0	0,00
72 hpi	C1	14605276	11160267,3	0,84
	C2	21405347	13577078,4	1,03
	I1	15951640	9992364,74	0,76
	I2	8118740	6210796,09	0,47
	I3	33195983	28990795,6	2,19

Discusión general

Para determinar espacial y temporalmente los efectos fisiológicos y variaciones en la expresión génica es necesario conocer cómo se desarrolla el ciclo de enfermedad de un patógeno en su interacción con la planta. En primer lugar, la forma de inóculo del patógeno debe ser viable bajo las condiciones experimentales ensayadas, lo que fue valorado con pruebas de viabilidad de los microesclerocios encontrándose un porcentaje de germinación que varió en medio PDA en más del 80% a más del 90% entre las 24 y 48 hpi, y de más del 35% al 86% transcurridas las 48 h tras el contacto de los microesclerocios y las plántulas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente por Smith, (1969). El seguimiento del ciclo de enfermedad reveló el inicio de la germinación de los microesclerocios entre las 6 y las 12 hpi, así como la presencia de estructuras de penetración similares a los apresorios (Ammon *et al.*, 1975) o hifopodios (Chowdury *et al.*, (2014) transcurridas las 48 hpi, identificándose una colonización superficial de las hifas del patógeno a las 72 hpi.

Una vez se conocieron los eventos que deben de marcar el inicio del resto de respuestas se estudiaron, en varios tiempos post-inoculación, la respuesta fisiológica y transcriptómica. A nivel de respuesta fisiológica, evaluada mediante medida de la fluorescencia de la clorofila *a* y cálculo de los parámetros F_0 y F_v/F_m (eficiencia del fotosistema II), las variaciones significativas aparecieron a partir de las 120 y 144 hpi en el parámetro F_v/F_m , una vez se produjo la penetración al interior de la raíz, y se supone la colonización del sistema vascular (Chowdury *et al.*, 2014). Las variaciones en estos parámetros evaluados son similares a lo ocurrido en infecciones de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por *Puccinia psidii* Winter. (Alonso *et al.*, 2011). Por otra parte, los resultados indican que los patógenos de raíz también provocan estrés a nivel general en la planta, y son detectables mediante medida de la fluorescencia de la clorofila *a* debido al reducido tamaño de las plántulas a los pocos días tras la germinación de las semillas.

De igual forma fueron estudiadas las respuestas a nivel transcriptómico. No se observaron diferencias atribuibles a la infección por el patógeno en ninguno de los genes candidatos ensayados, *SCL* y *COMT*. El gen *SCL* no muestra variaciones en su expresión inducidas por la presencia del patógeno, a pesar de haberse encontrado en respuesta frente a

patógenos necrotrofos de acículas de *P. radiata* (Frías, 2012), quizás debido a que su rol fundamental a nivel radicular sea funcionar como factor de transcripción en el desarrollo y mantenimiento de meristemas (Bolle, 2004). Para el gen de la ruta de biosíntesis de lignina, *COMT*, tampoco fueron observadas diferencias de expresión entre las plántulas control y las plántulas inoculadas, a diferencia de lo anteriormente reportado (Hawkins y Boudet, 2003) como mecanismo de defensa inducido por la infección por patógenos. A nivel transcriptómico las diferencias en la expresión de las diferentes réplicas quizás puede ser debido a la existencia de diferentes genotipos de plántulas pues fue empleada una mezcla de semillas de diferentes familias. Además, sería necesario la extensión de los tiempos de estudio post-inoculación para conocer como varía la expresión de estos genes a lo largo del tiempo.

En esta tesis ha sido reportado por primera vez el proceso infectivo del patógeno *M. phaseolina* en una especie forestal de interés comercial como es *P. radiata*, identificando los eventos que desencadenan el resto de respuestas fisiológicas y molecular. Los resultados obtenidos para la respuesta fisiológica a nivel de eficiencia del fotosistema II apoyan la búsqueda espacial y temporal de expresión de genes relacionados con el metabolismo primario en la parte aérea. Sin embargo, los genes empleados para conocer la variación en la expresión génica en respuesta al patógeno no han sido los adecuados y no permiten sacar conclusiones sobre la implicancia de los mismos en la interacción planta-patógeno.

Conclusiones generales

El patosistema *Macrophomina phaseolina-Pinus radiata* permite estudiar los eventos del ciclo de enfermedad que desencadenan la respuesta a patógenos a nivel fisiológico y transcripcional.

La germinación de los microesclerocios ocurre al menos a las 12 horas post-inoculación y la penetración de las hifas al interior de la raíz a las 48 hpi, permitiendo acotar espacial y temporalmente las respuestas fisiológicas y transcriptómicas.

La eficiencia del fotosistema II disminuye luego de la penetración del patógeno al interior de las raíces, siendo una buena herramienta para definir los tiempos en estudios transcriptómicos de órganos aéreos y como medida del estrés biótico.

Los genes *SCL* y *COMT* no son marcadores de la respuesta defensiva en las raíces de plántulas de *Pinus radiata* inoculadas con *Macrophomina phaseolina*.

Existe un ajuste temporal entre los eventos a nivel histológico y la respuesta fisiológica de la planta, no así con la expresión de los genes *SCL* y *COMT*.

Referencias bibliográficas generales

- Adams, J. (2008). Transcriptome: connecting the genome to gene function. *Nature Education 1*.
- Adomas, A., Heller, G., Li, G., Olson, K., Chu, T.-M., Osborne, J., Craig, D., Van-Zyl, L., Wolfinger, R. y Sederoff, R. (2007). Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiol.* 27, 1441–1458.
- Ahuja, I., Kissen, R. y Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17, 73–90.
- Alonso, A., Da Silva, L.M., Rodrigues, A., Murilo, F. y Couto, A. (2011). Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiol. Plant.* 9 p.
- Alvarez, C., Valledor, L., Sáez, P., Hasbún, R., Sánchez-Olate, M., Ríos, D.. 2014. Changes in gene expression in needles and stems of *Pinus radiata* rooststock plants of different ontogenic age. *Am. J. Plant Sci.*
- Ammon, V., Wyllie, T.D. y Brown, M.F. (1974). An structural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in seedlings of soybean, *Glycyne max* (L.) Merrill. *Physiol. Plant Pathol.* 4, 4 p.
- Ammon, V., Wyllie, T.D. y Brown, M.F. (1975). Investigation of infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. *Mycopathologia* 55, 77–81.
- Ayanru, D.K.G. y Green Jr, R.J. 1973. Alteration of germination patterns of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* on soil surfaces. *Phytopathology*, 64: 595-601.
- Barnard, E.L. (1996). Charcoal root and black root rots. *Plant Pathology Circular*, 2 p.
- Berger, S., Sinha, A.K. y Roitsch, T. (2007a). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J.Exp. Bot.* 58, 4019–4026

- Berger, S., Benediktyová, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L. y Roitsch, T. (2007b). Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J.Exp. Bot.* 58, 797–806.
- Bilgin, D.D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R. y DeLucia, E.H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell Environ.* 33, 1597–1613.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683–692.
- Bressano, M., Giachero, M.L., Luna, C.M. y Ducasse, D.A. (2010). An in vitro method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Mol. Plant P.* 74, 201–204.
- 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.
- Chowdury, S., Basu, A., Chaudhuri, T.R. y Kundu, S. (2014). In-vitro characterization of the behaviour of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid at the rhizosphere and during early infection of roots of resistant and susceptible varieties of sesame. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 361–375.
- Dhar, T.K., Siddiqui, K.A.I., Ali, E. (1982). Structure of phaseolinone, a novel phytotoxin from *Macrophomina phaseolina*. *Tetrahedron Lett*, 23 (5): 5459–5462.
- Omari, B. E., Fleck, I., Aranda, X., Moret, A. y Nadal, M. (2001). Effect of fungal infection on leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence in *Quercus ilex*. *Ann. For. Sci* 58, 165–173.
- Eckardt, N.A. (2002). Probing the Mysteries of Lignin Biosynthesis: The Crystal Structure of Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-*O*-Methyltransferase Provides New Insights. *Plant Cell.* 14: 1185-1189.
- Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D. y Coaker, G. (2011). Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Curr Opin Plant Biol.* 14, 365–371.

Freeman, B.C. y Beattie, G.A. (2008) . An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

Frías, J.P. (2012). Expresión de genes PR y WRKY en *Pinus radiata* ante la inoculación con el patógeno *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx. Universidad de Concepción. Chile. 57 p.

Gacitúa, S., Rubilar, R. y Sanfuentes, E. (2013). Temporal analysis of charcoal root rot in forest nurseries under different pathogen inoculum densities and soil moisture content. *Trop. Plant Pathol.* 38 (3):179-187.

Gaige, A.R., Ayella, A. y Shuai, B. (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 412–418.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–27

Gosal, S., Wani, S. y Kang, M. (2009). Biotechnology and Drought Tolerance. *J. Crop Im.* 23:19–54.

Hammond-Kosack, J. y Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* 8: 1773-1791.

Hawkins, S. y Boudet, A. (2003). “Defence lignin” and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *For. Pathol.* 33:91–104.

Hinojosa, J.C. (1997). Susceptibilidad de algunas especies forestales nativas chilenas a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Universidad de Concepción. Chile), 109 p.

Islam, M.S., Haque, M.S., Islam, M.M., Emdad, E.M., Halim, A., Hossen, Q.M.M., Hossain, M.Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, M.S., Alam, M.M., Hou, S., Wan, X., Saito, J. y Alam, M. (2012) Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics.* 13:493.

Iturrutxa, E. (2001). Evaluación del estado de las masas forestales de *Pinus radiata* en las provincias de Bizkaia y Araba. (Informe técnico del Proyecto de Sanidad Forestal 2001. Neiker-Tecnalia. Vitoria. Gobierno Vasco), 190 p.

Jiménez-Díaz, R. y Montes-Agustí, F. (1974). *Sclerotium bataticola* Taub. patógeno de la soja (*Glycine max*) en España. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Protección Vegetal 4, 19–25.

Johnk, N., Hietala, A.M., Fossdal, C.G., Collinge, D.B. y Newman, M.-A. (2005). Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). Tree Physiology 25, 1533–1543.

Joye, G.F. y Paul, R.N. (1992). Histology of infection of *Hydrilla verticillata* by *Macrophomina phaseolina*. Weed Sci. 40, 288–295.

Kaur, S., Singh, G., Kaur, S., Vallad, G.E., Chand, R. y Bahadur, V. (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. Critical Reviews in Microbiology. 16 p.

Khong, G.N., Richaud, F., Coudert, Y., Pati, P.K., Santi, C., Perin, C., Breitler, J.-C., Meynard, D., Vinh, D.N. y Guiderdoni, E. (2008). Modulating rice stress tolerance by transcription factors. Biotechnol. Genet. Eng. 25, 381–404.

Kocal, N., Sonnewald, U. y Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Plant Physiol. 148, 1523–1536.

Luque, J., Cohen, M., Savé, R., Biel, C. y Álvarez, S.F. (1999). Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. Ann. For. Sci. 56: 19-26.

Mah, K.M., Uppalapati, S.R., Tang, Y., Allen, S. y Shuai, B. (2012). Gene expression profiling of *Macrophomina phaseolina* infected *Medicago truncatula* roots reveals a role for auxin in plant tolerance against the charcoal rot pathogen. Physiol. Mol. Plant P. 79, 21–30.

Maxwell, K. y Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J Exp. Bot. 51: 659-668.

- Mazid, M., Khan, T.A. y Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Iss. Biom. M.* 3, 232–249.
- McCain, A.H. y Scharpf, R.F. (1989). Effect of inoculum density of *Macrophomina phaseolina* on seedling susceptibility of six conifer species. *Eur. J. For. Path.* 19, 119–123.
- Meyer, W.A. y Sinclair, J.B. (1974). Factors affecting charcoal rot of soybean seedlings. *Phytopathol.* 64, 845–849.
- Muñoz, H. (2006). Análisis espacial de la enfermedad “pudrición carbonosa de la raíz” (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) en una plantación de *Pinus radiata* D. Don. (Universidad de Concepción. Chile), 25 p.
- Murchie, E.H. y Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64 (13): 3983–3998.
- Nelson, E.B. (1991). Exudate moleculares inician fungal responses to seeds and roots. *The rhizosphere and plant growth.* 197-209.
- Nicaise, V., Roux, M. y Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* 150: 1638-1647.
- Odjakova, M. y Hadjiivanova, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 27, 101–109.
- Papavizas, G.C. (1977). Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 337-341.
- Quentin, M., Allasia, V., Pegard, A., Allais, F., Ducrot, P.H., Favery, B., Levis, C., Martinet, S., Masur, C., Ponchet, M., Roby, D., Schlaich, N.L., Jouanin, L. y Keller, H. (2009). Imbalanced lignin biosynthesis promotes the sexual reproduction of homothallic oomycete pathogens. *PLoS Pathog* 5:e1000264
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

Gaige, A., Ayella, A. y Shuai, B. (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Molecul. Plant P.* 74, 412–418.

Rosenqvist, E. y van Kooten O. (2006). Chlorophyll Fluorescence: A General Description and Nomenclature. From Chapter 2 “Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology”. Eds DeEll, J.R., Toivonen, M.A.P. Kluwer Academic Publishers. 31-77.

Schafer, H. y Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* 4, 1684–1703.

Sebela, D., Olejníčková, J., Župčanová, A. y Sotolář, R. (2012). Response of grapevine leaves to *Plasmopora viticola* infection by means of measurement of reflectance and fluorescence signals. *Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 60, 229–237.

Seidenberger, R., Mikolajewski, S., Lutz, A., Seigner, E., Seefelder, S. y Weber, W. E. (2007). cDNA-AFLP markers for powdery mildew resistance in hops (*Humulus lupulus* L.). *Proc. Sci. Commission.* 67-70.

Shaner, G., Abney, S. y Scott, D. (1999). Charcoal rot of soybeans. (Purdue University. Department of Botany and Plant Pathology. W. Lafayette), 2 p.

Short, G.E., Wyllie, T.D. y Bristow, P.R. (1980). Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. *Phytopathol.* 70, 13–17.

Sinclair, J. (1982). Compendium of soybean diseases. (St. Paul: The American Phytopathological Society). 128 p.

Singh, K.B., Foley, R.C. y Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factor in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 430–436.

Singh, P., Bawankar, R., Gothandam, K.M., Subashkumar, R., Vivekanandhan, G., Thayumanvan, T. y Babu, S. (2012). “Master switch” genes for disease resistance in rice: lessons learnt and lessons to learn. *Res. Biotechnol.* 3, 70–75.

- Singh, N.K., Kumar, K.R.R., Kumar, D., Shukla, P., Kirti, P.B. (2013) Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene *AdTLP* from *Arachis diogeni*, a Wild Peanut. PLoS ONE 8(12): e83963. doi:10.1371/journal.pone.0083963
- Smith, W.H. (1969). Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. J. Microbiol. 15, 1387–1391.
- Smith, R.S., Hodges, C.S. y Cordell, C.E. (1989). Charcoal root rot and black root rot: Forest nursery pest. In Agriculture Handbook, (U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C., USA.), pp. 112–113.
- Songa, W. y Hillocks, R.J. (1996). Legume hosts of *Macrophomina phaseolina* in Kenya and effect of crop species on soil inoculum level. J. Phytopathol. 144, 387–391.
- Valladares, F. y Pearcy, R.W. (1997). Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. Plant Cell Environ. 20: 25-36.
- Van Verk, M.C., Gatz, C. y Linthorst, H.J.M. (2009). Transcriptional regulation of plant defense responses. Adv. Bot. Res. 51: 397-438.
- Veluthakkal, R. y Ghosh, M. (2010). Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species. Trees, 14 p.
- Wagner, A., Michalek, W. y Jamiolkowska, A. (2006). Chlorophyll fluorescence measurements as indicators of fusariosis severity in tomato plants. Agronomy Research, 4: 461-464.
- Wang, H. y Jons, R.W. (1995). A unique endoglucanase-encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2004–2006.
- Zeyen, R.J., Carver, T.L. y Lyngkjaer, M.F. (2002). ‘Epidermal cell papillae’ in The Powdery Mildews: A comprehensive Treatise, eds R.R. Belanger, W.R. Buschnell, A.J. Dik y T.L.W. Carver (St. Paul, MN: APS Press), 107-125.

Zhang, Y. y Wang, L. (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol.* 5, 12 p.