



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

**CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN DE  
*Phytophthora pinifolia* Y EFECTO DE LA TEMPERATURA Y MOJAMIENTO  
FOLIAR EN LA INFECCIÓN DEL PATÓGENO EN PLANTAS DE *Pinus radiata*.**



Magister en Ciencias Forestales

MARCO ANTONIO SABAG DE LA BARRA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

Profesor Guía: Alfredo Sanfuentes Von Stowasser  
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales  
Universidad de Concepción

**CONDICIONES PARA EL CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN DE *Phytophthora pinifolia* Y EFECTO DE LA TEMPERATURA Y MOJAMIENTO FOLIAR EN LA INFECCIÓN DEL PATÓGENO EN PLANTAS DE *Pinus radiata*.**

**Comisión Evaluadora:**

Alfredo Sanfuentes V.  
Ingeniero Forestal, Dr.

---

Miguel Castillo Salazar.  
Ingeniero Forestal, Dr.

---

Eduardo Acuña Salazar  
Ingeniero Forestal, Dr.

---

**Director de Postgrado:**

Darcy Ríos L.  
Prof. Biología y Química, Dr.

---

**Decano Facultad de Ciencias Forestales:**

Manuel Sánchez O.  
Ingeniero Forestal, Dr.

---



## AGRADECIMIENTOS



## INDICE

RESUMEN.....	6
SUMMARY .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
<b>I. Antecedentes generales.....</b>	<b>8</b>
<b>II. Características de especies del genero <i>Phytophthora spp.</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>III. Situación de <i>P. pinifolia</i> en <i>Pinus radiata</i> .....</b>	<b>12</b>
METODOLOGÍA .....	15
<b>1. Efecto del medio de cultivo y la temperatura para el crecimiento de <i>Phytophthora pinifolia.</i> .....</b>	<b>15</b>
1.1 Cepas de <i>P. pinifolia</i> .....	15
1.2 Efecto del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de <i>P. pinifolia</i> .....	15
1.3 Efecto de la temperatura el crecimiento de <i>P. pinifolia</i> .....	15
<b>2. Factores asociados con la producción de estructuras reproductivas y formación de estructuras sexuales de <i>P. pinifolia</i> .....</b>	<b>16</b>
2.1. Efecto del medio de cultivo sobre la producción de estructuras reproductivas sexuales. ....	16
2.2. Producción de estructuras reproductivas sexuales mediante apareamientos de cepas de <i>P. pinifolia</i> con otras especies de <i>Phytophthora</i> . ....	16
<b>3. Cantidad de inóculo de <i>P. Pinifolia</i> para causar infección en plantas de <i>P. radiata</i> ..</b>	<b>17</b>
3.1 Producción de inóculo. ....	17
3.3 Efecto de la cantidad de inóculo de <i>P. pinifolia</i> e infección en plantas de <i>P. radiata</i> ..	18
<b>4. Análisis estadístico .....</b>	<b>19</b>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
<b>1. Efecto de del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de de <i>Phytophthora pinifolia.</i> .....</b>	<b>20</b>
1.1. Efecto del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de <i>P. pinifolia</i> ....	20
1.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento en diferentes aislados de <i>P. pinifolia</i> ..	21
<b>2. Producción de estructuras reproductivas sexuales mediante apareamientos de cepas de <i>P. pinifolia</i> y con otras especies de <i>Phytophthora</i>. ....</b>	<b>23</b>
2.1. Paramientos entre cepas de <i>P. pinifolia</i> .....	23
2.2. Paramientos con otras especies de <i>Phytophthora</i> .....	24
<b>3. Cantidad de inóculo de <i>P. pinifolia</i> para infectar plantas de <i>P. radiata</i> .....</b>	<b>25</b>
3.1. Producción de inóculo de <i>P. pinifolia</i> . ....	25
3.2. Método de Inoculación en plantas de <i>P. radiata</i> . ....	26
3.3. Efecto de la cantidad de inóculo de <i>P. pinifolia</i> en infección de <i>P. radiata</i> . ....	26
3.4. Efecto de la temperatura y mojamiento foliar en la infección .....	27
CONCLUSIÓN.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA .....	30

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantación de <i>Pinus radiata</i> con alta incidencia de <i>Phytophthora pinifolia</i> , con presencia marchitamiento apical. ....	13
<b>Figura 2.</b> Producción de inóculo de <i>Phytophthora pinifolia</i> . Acículas de <i>Pinus radiata</i> dispuestas sobre colonias de <i>Phytophthora pinifolia</i> . ....	17
<b>Figura 3.</b> Muestra de métodos de inoculación de acículas de <i>Pinus radiata</i> con suspensión de zoosporas de <i>Phytophthora pinifolia</i> : Aspersión (A) y Inmersión (B). ....	18
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de la colonia de <i>Phytophthora pinifolia</i> a temperaturas de incubación de 20 y 25 °C, en medios de cultivo: agar arveja (AR), agar avena (AV), agar zanahoria (AZ), agar harina de maíz (CMA), agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz con jugo V8 (V8) y P<0,05 (*). ....	20
<b>Figura 5.</b> Crecimiento promedio de las colonias de <i>Phytophthora pinifolia</i> cepa 56, 83 y 448 a temperaturas de 20 y 25°C en medios de cultivo: agar arveja (AR), agar avena (AV), agar zanahoria (AZ), agar harina de maíz (CMA), agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz con jugo V8 (V8) y P<0,05 (*). ....	21
<b>Figura 6.</b> Crecimiento micelial de <i>Phytophthora pinifolia</i> en medio agar avena (AV) y agar zanahoria (AZ) incubadas entre incubadas a 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. (*) P<0,05. ....	22
<b>Figura 7.</b> Crecimiento micelial de cepas <i>Phytophthora pinifolia</i> 56, 83 y 448, en medio agar avena (AV) y agar zanahoria (AZ) incubadas a 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. (*) P<0,05. ....	23
<b>Figura 8.</b> Micelio de aislados de <i>Phytophthora pinifolia</i> cultivados en diferentes medios de cultivo: AA (A), AZ (B), V8 10% (C), CMA (D) y PDA (E). ....	24
<b>Figura 9.</b> Pareamiento interespecifico <i>in vitro</i> entre aislados de <i>Phytophthora pinifolia</i> y otras especies de <i>Phytophthora</i> . <i>Phytophthora pinifolia</i> x <i>Phytophthora capsici</i> (A) y <i>Phytophthora pinifolia</i> x <i>Phytophthora megasperma</i> (B). ....	24
<b>Figura 10.</b> Pareamiento interespecífico entre aislados de <i>Phytophthora pinifolia</i> y otras especies de <i>Phytophthora</i> . <i>P. pinifolia</i> x <i>P. cinnamomi</i> (A), <i>P. pinifolia</i> x <i>P. megasperma</i> (B) (vista microscópica 100x). ....	25
<b>Figura 11.</b> Producción de zoosporas de <i>Phytophthora pinifolia</i> en acículas de <i>Pinus radiata</i> inoculadas en colonias del patógeno, incubadas durante 4 y 8 días, a 25°C, en oscuridad y evaluadas después de 24 y 48 horas en ADE. ....	26
<b>Figura 12.</b> Método de inoculación de acículas de <i>Pinus radiata</i> con suspensión de zoosporas de <i>Phytophthora pinifolia</i> por medio de inmersión y aspersion. ....	26
<b>Figura 13.</b> Infección en acículas de <i>Pinus radiata</i> (%) con diferentes cantidades zoosporas de <i>Phytophthora pinifolia</i> , en plantas mantenidas a 10°C. (A, B) letras diferentes implica diferencia significativa entre diferentes dosis de inoculación P<0,05 (*). ....	27
<b>Figura 14.</b> Número de acículas de <i>Pinus radiata</i> que presentaron <i>Phytophthora pinifolia</i> de acuerdo con diferentes tiempos de inmersión y temperaturas de incubación. ....	28

## RESUMEN

*Phytophthora pinifolia* es el oomiceto agente causal de la enfermedad “daño foliar del pino” (DFP) en plantaciones de *Pinus radiata* en Chile. El patógeno fue identificado el año 2008, por lo que aún son escasos los estudios relacionados sobre la biología y epidemiología del patógeno. Por esta razón, el objetivo del estudio fue establecer el efecto de variables ambientales para el crecimiento y reproducción de *P. pinifolia* y en la capacidad de infectar plantas de *P. radiata*. Fueron utilizadas diversas cepas de *P. pinifolia*, y en ensayos in vitro fueron probadas en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, y realizados pareamientos entre cepas de *P. pinifolia* y cepas de otras especies de *Phytophthora*, para observar la formación de estructuras sexuales. Fueron realizados ensayos para determinar la mínima cantidad de inóculo para causar infección y el efecto de la temperatura y mojamiento foliar en la infección de *P. pinifolia*. En ambos ensayos se inocularon zoosporas del patógeno, inoculándose fascículos y plantas de *P. radiata*, respectivamente. El óptimo crecimiento micelial de *P. pinifolia* fue entre 20 a 25°C, no existiendo interacción significativa entre cepas del patógeno y temperatura. No se detectó la formación de estructuras reproductivas de *P. pinifolia* en condiciones in vitro. La infección de *P. pinifolia* en plantas de *P. radiata* se produce con un mínimo de 100 zoosporas ml<sup>-1</sup>, 6 h de mojamiento foliar y con un óptimo para infectar a 10°C. Estos antecedentes permitirán poder establecer relaciones con el comportamiento de la enfermedad y condiciones de campo.

## SUMMARY

*Phytophthora pinifolia* is the oomycete causal agent of the disease “pine leaf damage” (DFP) in *Pinus radiata* plantations in Chile. The pathogen was identified in 2008, so there are still few related studies on the biology and epidemiology of the pathogen. For this reason, the objective of the study was to establish the effect of environmental variables for the growth and reproduction of *P. pinifolia* and on the ability to infect *P. radiata* plants. Various strains of *P. pinifolia* were used, and in in vitro tests they were tested in different culture media and incubation temperatures, and pairing was made between strains of *P. pinifolia* and strains of other *Phytophthora* species, to observe the formation of sexual structures. Trials were conducted to determine the minimum amount of inoculum to cause infection and the effect of temperature and foliar wetting on *P. pinifolia* infection. In both tests, zoospores of the pathogen were inoculated, inoculating fascicles and *P. radiata* plants, respectively. The optimal mycelial growth of *P. pinifolia* was between 20 to 25°C, with no significant interaction between strains of the pathogen and temperature. The formation of reproductive structures of *P. pinifolia* was not detected under in vitro conditions. Infection of *P. pinifolia* in *P. radiata* plants occurs with a minimum of 100 zoospores ml<sup>-1</sup>, 6 h of foliar wetting and with an optimum to infect at 10°C. These antecedents will allow to establish relationships with the behavior of the disease and field conditions.

## INTRODUCCIÓN

### I. Antecedentes generales

La especie *Pinus radiata* D. Don es originaria de California, EE.UU. y en general es cultivada en zonas de clima mediterráneo como algunas partes de Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Chile, España y Uruguay (Rogers 2004). En Chile, de los 2,1 millones de ha. de plantaciones forestales, un 66% corresponden a *P. radiata*, concentrándose 44% en la Región del Biobío con aproximadamente 608.000 ha. En la Región, el sector forestal proporciona cerca de 50 mil empleos directos y 100 mil empleos indirectos, abarcando el 76% de las exportaciones forestales a nivel nacional, un 70% de la producción nacional de celulosa, 58% de la producción de madera aserrada, y un 83% de la fabricación de tableros y chapas en el país (INFOR 2018).

La relevancia de las plantaciones de *P. radiata* en Chile, se manifiesta al representar más de un tercio de la superficie que ocupa esta especie a nivel mundial (Guerrero & Bustamante 2007) y junto con especies del género *Eucalyptus*, son las principales especies de interés económico para el desarrollo productivo forestal en Chile. Por tanto, las plantaciones de *P. radiata* son un pilar de la economía chilena, aportando con un 3,1% del producto interno bruto (PIB) y generando más de 300.000 empleos, alcanzando un nivel de producción anual de 41.043 Mm<sup>3</sup> ssc (INFOR 2018).

La productividad de *P. radiata* puede verse seriamente afectada producto del ataque de diversas plagas, traduciéndose en pérdidas económicas para los propietarios forestales, debido a la disminución del crecimiento, malformaciones del fuste, pérdida de la calidad de la madera y muerte de las plantas. Agentes de daño tales como *Dothistroma septosporum* M. Morelet y *Rhyacionia buoliana* Schiff han sido uno de los problemas sanitarios más importantes en plantaciones de *P. radiata* en Chile (Ahumada 2003). En el año 2004 es detectada una nueva enfermedad que se denominó Daño Foliar del Pino (DFP) cuyo agente causal fue identificado el año 2007 como *Phytophthora pinifolia* A. Durán, Gryzenh. & M.J. Wingfield (Durán *et al.* 2008; Wingfield 2007).

## II. Características de especies del genero *Phytophthora* spp.

El género *Phytophthora* está incluido en el Reino – *Straminopila*; Filum – *Heterokontophyta* Clase – *Oomycetes*; Orden – *Peronosporales*; Familia – *Pythiaceae* (Erwin y Ribeiro 1996). Las *Phytophthora* son similares a hongos verdaderos por su forma de crecimiento (hifas), y su reproducción (esporas), pero a diferencia de los hongos, sus paredes celulares están compuestas principalmente por celulosa, las hifas carecen de septos (micelio cenocítico) y poseen zoosporas biflageladas capaces de movilizarse en el agua (Erwin y Ribeiro 1996; Alexopoulos *et al.* 1996). Las especies de *Phytophthora* están adaptadas a diversos hospederos y ambientes, desarrollando distintos tipos de estructuras especializadas de dispersión, infección o sobrevivencia, (Agris 2005). Las oosporas son esporas que resultan de la fertilización del oogonio (gametangio femenino) por el anteridio (gametangio masculino), de pared gruesa, generalmente de forma redonda, lo que le otorga resistencia en tejidos y suelo (Ciampi 2002). Algunas *Phytophthora* son auto fértiles (homotálicas), mientras que otras son heterotálicas, es decir, requieren de una fertilización cruzada entre dos tipos de apareo. La principal estructura de resistencia ante condiciones desfavorables del medio, presente en algunas especies de *Phytophthora*, son clamidosporas, las cuales poseen doble pared, son de forma redonda y de gran tamaño (Alexopoulos *et al.* 1996).

Existen más de 80 especies de *Phytophthora* descritas, siendo todas patógenas en alguna especie vegetal (Brasier 2008). Dentro de los factores que determinan las especies de *Phytophthora* cause tanto daño en una gran variedad de cultivos agrícolas y forestales, son las condiciones ambientales que requiere para germinar, ya que basta con una capa de agua libre sobre el tejido vegetal o condiciones de alta humedad (Erwin y Ribeiro 1996), para que las oosporas y/o clamidosporas germinen formando esporangióforos que dan lugar a esporangios (Aragaki 1967). En algunas especies de *Phytophthora*, los esporangios pueden desprenderse (caducos) por efecto del viento o agua permitiendo la dispersión a plantas cercanas (Newman *et al.* 2008). Los esporangios maduros, liberan zoosporas, que gracias a sus dos flagelos son capaces de movilizarse por capas de agua en las superficies de tejidos, pudiendo también actuar como agentes de infectivos, germinando directamente, formando esporangióforos o hifas (Newman *et al.* 2008). Cuando las zoosporas entran en contacto con el tejido del hospedero (bajo condiciones ideales), dejan de nadar y pierden sus flagelos, en

un proceso conocido como enquistamiento (Erwin *et al.* 1983). Los cistos germinan por una hifa que penetra los tejidos del huésped iniciando la infección. Una vez que *Phytophthora spp.* infecta, coloniza y desarrolla estructuras reproductivas, completa su ciclo de vida y produce inóculo para generar nuevas infecciones en la planta o en otras plantas (Agrios, 2005).

Una de las particularidades de las especies de *Phytophthora*, es el alto potencial de daño que pueden producir al contar con las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo. Algunas especies de este género pueden desarrollarse en un amplio rango de temperaturas. Estudios en condiciones controladas indican que *P. ramorum* tiene un amplio rango de crecimiento de 10 a 31°C, siendo necesaria solo una hora de mojamiento para causar infección en plantas de *Rhododendron sp.* (Tooley *et al.* 2009). De igual forma *P. palmivora* y *P. nicotianae* pueden crecer entre 17 a 33°C y en cítricos, son capaces de causar infección luego de tres horas de mojamiento foliar (Timmer *et al.* 2000). Estudios realizados en *P. infestans* han demostrado que posee un amplio rango de temperatura de crecimiento (5-28°C) y que en ensayos de inoculación en papas provoca infección después de horas de mojamiento (Rotem *et al.* 1970).

Las especies de *Phytophthora* descritas fueron clasificadas morfológicamente en seis grupos (Waterhouse 1963). Posteriormente, mediante herramientas moleculares, se generó un nuevo sistema de clasificación, que organizó las especies de *Phytophthora* de acuerdo a la relación entre sus secuencias de ITS (Internal Transcribed Spacers) en ocho clados (Cooke *et al.* 2000). Otros autores incorporaron otros dos clados a la clasificación, mediante la utilización de más loci informativos, como ADN ribosomal 28S, proteína ribosomal 60S, beta-tubulina, factor de elongación 1 alfa y enolasa (Blair *et al.* 2008).

Son variados los ejemplos de especies de *Phytophthora* devastadoras en distintos cultivos. En 1840 cientos de hectáreas de cultivos de papa, en Irlanda, sufrieron del tizón de la papa a causa de ataques de *P. infestans*, provocando hambruna y la migración de miles de personas a otros países europeos y Estados Unidos (Agrios 2005). *P. cinnamomi* es conocido por ser patógeno en más de mil especies de plantas, encontrándose distribuido de forma cosmopolita (Erwin y Ribeiro 1996). Por otra parte, *P. ramorum*, causante del “Sudden Oak Death” (SOD),

ha sido recientemente descubierto, siendo el causante de la muerte en robles americanos en California (Rizzo *et al.* 2002).

Desde la década de los 70 a la fecha se ha continuado detectando nuevas especies de *Phytophthora* en bosques y plantaciones forestales, así en Europa se ha identificado: *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *uniformis*, *P. alni* sub sp. *multiformis*, en *Alnus* sp, *P. inundata* en *Oleae*, *Aesculus* y *Salix*; en *Quercus* spp., están *P. quercina*, *P. uliginosa*, *P. psychrophila* y *P. pseudosyringae* en *Myrtus*, *P. itálica*, *P. ramorum* y *P. europaea* en suelos de bosques, (Brasier y Jung 2006). *P. hidraïandra*, *P. kernoviae*, *P. polonica* y *P. gallica* (Jung *et al.* 2007). En Norteamérica, agregan *P. sansomeana* en plantas en vivero de pino oregon y *P. quercetorum* en *Quercus* (Frankel y Hansen 2011) y, *P. obscura* en *Aesculus* (Grünwald *et al.* 2012). En América del Sur, *P. austrocedrae* fue determinada como la causa de la muerte del ciprés de cordillera (*Austrocedrus chilensis*) en el sur de Argentina (Greslebin y Hansen 2010). Últimamente se han descrito siete nuevas especies de *Phytophthora*: *P. captiosa* y *P. fallax* en *Eucalyptus* spp. en Nueva Zelanda (Dick *et al.* 2006), *P. frigida* y *P. alticola* en Sudáfrica (Maseko *et al.* 2007) y en Australia, *P. lateriticola*, *P. multivora* y *P. elongata* (Scott *et al.* 2009, Edwards *et al.* 2011). En Inglaterra se identificó *P. kernoviae* en follaje con necrosis en *Gevuina avellana* y *D. winteri*, causadas por *P. Kernoviae* (Brasier *et al.* 2005).

En Chile, recientemente se han detectado especies de importancia en forestal en otras partes del mundo, como *P. pseudosyringae* aislado desde canchales y rizósfera de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. (Fajardo *et al.* 2017) y *P. kernoviae* asociado a *Drymis winteris* J.R Forst & G.Forst (Sanfuentes *et al.* 2016)

### III. Situación de *P. pinifolia* en *Pinus radiata*

En Chile desde el año 2003, se ha observado la presencia de daños en el follaje de *Pinus radiata* denominado Daño Foliar del pino (DFP), identificándose el agente causal el año 2007 una nueva especie de *Phytophthora*, denominándola *P. pinifolia* (Duran *et al.* 2008). Para este patógeno no existían registros a nivel mundial, por lo que se desconocían absolutamente aspectos relacionados a la biología del agente, así como del comportamiento de la enfermedad y de los factores ambientales que la influyen (Sanfuentes *et al.* 2012). El DFP se ha detectado principalmente en plantaciones localizadas en el suroeste de la Región del Biobío, principalmente en la Provincia de Arauco (-37244674; -37320693), y en algunos sectores de la Región de la Araucanía, Provincia de Cautín, y de la Región de Los Ríos, zona costera de la Provincia de Valdivia (-39826752; -73237210). Los síntomas asociados al DFP se caracterizan por una decoloración progresiva del follaje de los árboles, tornándose las acículas de una tonalidad amarillo - grisácea durante el invierno, hasta quedar de color rojizo al final de la primavera, produciéndose, posteriormente, la pérdida de este follaje en dos o más temporadas, con la consecuente disminución de productividad de las plantaciones afectadas, además del debilitamiento y potencial aumento de la susceptibilidad al ataque de plagas secundarias u oportunistas (Ahumada *et al.* 2012; SAG 2008)

Debido al efecto que ha provocado la enfermedad en las plantaciones de *P. radiata* en Chile, que llegó a 60.000 ha de plantaciones el año 2006 (Ahumada *et al.* 2013), se considera de gran importancia conocer acerca de esta patología y las posibles consecuencias sobre las exportaciones de productos de *P. radiata*. Entre los años 2010 y 2013 se ejecutó un proyecto Innova Biobío que tuvo como principal objetivo investigar los factores biológicos y aspectos epidemiológicos de la enfermedad (Sanfuentes *et al.* 2012).

Durante prospecciones realizadas en la zona de Valdivia, en plantaciones jóvenes de *P. radiata* que tenían una alta incidencia de DFP, se detectó muerte apical y de ramas en algunos ejemplares, aislándose desde tejidos necrosados *P. pinifolia* (Figura 1) (Sanfuentes *et al.* 2012).



**Figura 1.** Plantación de *Pinus radiata* con alta incidencia de *Phytophthora pinifolia*, con presencia marchitamiento apical.

Dado a la escasez de información respecto a *P. pinifolia*, es fundamental generar información relacionada al ciclo biológico de este patógeno y al ciclo de la enfermedad, hasta ahora desconocidos, para poder generar estrategias de control para el manejo integrado de la enfermedad.



## **HIPOTESIS:**

- El crecimiento micelial y la esporulación de *Phytophthora pinifolia* son dependientes de la temperatura, ambos con un comportamiento cuadrático, en un rango que fluctúa entre 10-30°C.
- Los aislados de *P. pinifolia* en Chile son heterotálicos.
- La expresión de síntoma de *P. pinifolia* en plantas de *P. radiata* son dependiente de la temperatura, el tiempo de mojamiento foliar y la densidad de inóculo del patógeno.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General**

Determinar los factores que optimizan el crecimiento micelial y esporulación de *Phytophthora pinifolia* y la infección del patógeno en plantas de *Pinus radiata*.

### **Objetivos Específicos**

- a. Determinar el efecto de la temperatura y medio de cultivo para el crecimiento de *Phytophthora pinifolia*.
- b. Evaluar formación de estructuras reproductivas sexuales en el patógeno.
- c. Determinar el efecto de la densidad de inóculo de *Phytophthora pinifolia* en la infección en *P. radiata*.
- d. Determinar las condiciones de temperatura y mojamiento foliar requeridas para la infección de *P. pinifolia* en *P. radiata*.



## METODOLOGÍA

### 1. Efecto del medio de cultivo y la temperatura para el crecimiento de *Phytophthora pinifolia*.

#### 1.1 Cepas de *P. pinifolia*

Para el desarrollo del estudio se utilizaron 12 cepas de *P. pinifolia* las cuales fueron obtenidas de diferentes localidades del país (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Distribución predio y localidades de las cepas de *Phytophthora pinifolia* utilizados en ensayos.

Cepa	Predio	Localidad
56	Peñas de Tubul	Arauco (37°14'39.36"S; 73°25'4.09"O)
60	Villa Alegre	Arauco (37°26'33.71"S; 73°28'3.27"O)
63	Villa Alegre	Arauco (37°26'33.71"S; 73°28'3.27"O)
64	Villa Alegre	Arauco (37°26'33.71"S; 73°28'3.27"O)
75	Villa Alegre	Arauco (37°26'33.71"S; 73°28'3.27"O)
76	Villa Alegre	Arauco (37°26'33.71"S; 73°28'3.27"O)
78	Llico	Arauco (37°12'55.72"S; 73°32'10.77"O)
83	Llico	Arauco (37°12'55.72"S; 73°32'10.77"O)
448	San José de La Mariquina	Valdivia (39°29'2.09"S; 73° 6'33.42"O)
492	San José de La Mariquina	Valdivia (39°29'2.09"S; 73° 6'33.42"O)
600	Llico	Arauco (37°12'55.72"S; 73°32'10.77"O)
601	Los Venados	Valdivia (39°28'0.52"S; 73° 5'45.84"O)

#### 1.2 Efecto del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de *P. pinifolia*

Fueron utilizadas las cepas de *P. pinifolia* 56, 83 y 448, las que fueron cultivadas en seis medios de cultivo; agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz (CMA), agar harina de maíz con jugo V8 (V8), agar zanahoria (AZ), agar avena (AV) y agar arveja (AR), creciendo a temperaturas de 20 y 25 °C, en oscuridad, durante 30 días. El crecimiento de *P. pinifolia* fue evaluado midiendo el diámetro de la colonia (dos mediciones perpendiculares) a los 7, 14, 21 y 28 días.

#### 1.3 Efecto de la temperatura el crecimiento de *P. pinifolia*

Fueron utilizadas las cepas de *P. pinifolia* 56, 83 y 448, cultivadas en AV y AZ, a temperaturas de incubación de 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C, en condiciones de oscuridad, durante 30 días. En ambos ensayos fueron empleadas cuatro réplicas por cada combinación medio-cepa y las evaluaciones del diámetro de la colonia se efectuaron a los 7, 14, 21 y 28 días de

incubación. Para para determinar la temperatura optima de crecimiento micelial, se realizaron las comparaciones con los valores obtenidos a los 28 días de incubación.

## **2. Factores asociados con la producción de estructuras reproductivas y formación de estructuras sexuales de *P. pinifolia***

Para el estudio de factores asociados con la producción de estructuras reproductivas se utilizaron cepas; *P. pinifolia*, *P. capsici*, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma*, *P. infestans* y *P. nicotianae* proporcionadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y 2 cepas UDEC de *P. pinifolia*.

### **2.1. Efecto del medio de cultivo sobre la producción de estructuras reproductivas sexuales.**

Para el estudio se utilizaron los medios de cultivo AA, AZ, V8 10 %, CMA y PDA, a tres temperaturas de incubación (15, 20 y 25 °C), y utilizándose las cepas de *P. pinifolia* 60, 63, 64, 75, 76, 78, 83, 492, 600, 601, con tres repeticiones por cepa. El ensayo se evaluó al día 30 después de la siembra, observándose la presencia de estructuras reproductivas sexuales en las zonas de traslape de las colonias mediante microscopía óptica (x100) (Zentmyer *et al.* 1979).

### **2.2. Producción de estructuras reproductivas sexuales mediante pareamientos de cepas de *P. pinifolia* con otras especies de *Phytophthora*.**

Para el estudio de estructuras reproductivas sexuales, se realizaron dos tipos de experimentos, en el primero se realizó el pareamiento entre cepas de *P. pinifolia* y en segundo se realizó el pareamiento entre una cepa de *P. pinifolia* y cepas de otras especies de *Phytophthora* (Aislados facilitados por el SAG). Para ambos experimentos se utilizaron placas con 10 ml de agar zanahoria utilizando tres repeticiones, las observaciones se realizaron mediante microscopia (100x) donde se observó la intersección de hifas de las colonias pareadas. Los discos de cada cultivo para los paramientos se dispusieron a 2 cm uno del otro (López *et al.* 1997).

#### **2.2.1 Paramientos entre cepa de *P. Pinifolia***

Se realizaron pareamientos entre diez cepas de *P. pinifolia* (60, 63, 64, 75, 76, 78, 83, 492, 600, 601), provenientes de distintas localidades, utilizando medio Agar Zanahoria. Las

evaluaciones se realizaron mediante microscopía, a los 15 y 30 días, buscando la presencia de estructuras reproductivas sexuales.

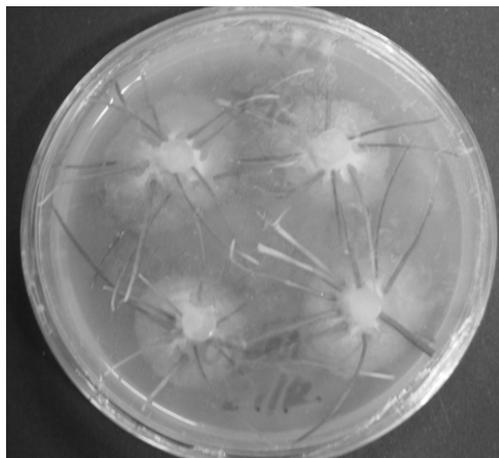
### 2.2.2. Paramientos entre diferentes *Phytophthora*

Se realizaron pareamientos entre una cepa de *P. pinifolia* y una cepa de *P. cinnamomi*, *P. cactorum*, *P. megasperma*, *P. capsici*, *P. nicotianae* (aislados entregados por el SAG) utilizando medio Agar Zanahoria. Las evaluaciones se realizaron mediante microscopía, cada siete días, durante un mes, buscando la presencia de estructuras reproductivas sexuales.

## 3. Cantidad de inóculo de *P. Pinifolia* para causar infección en plantas de *P.radiata*

### 3.1 Producción de inóculo.

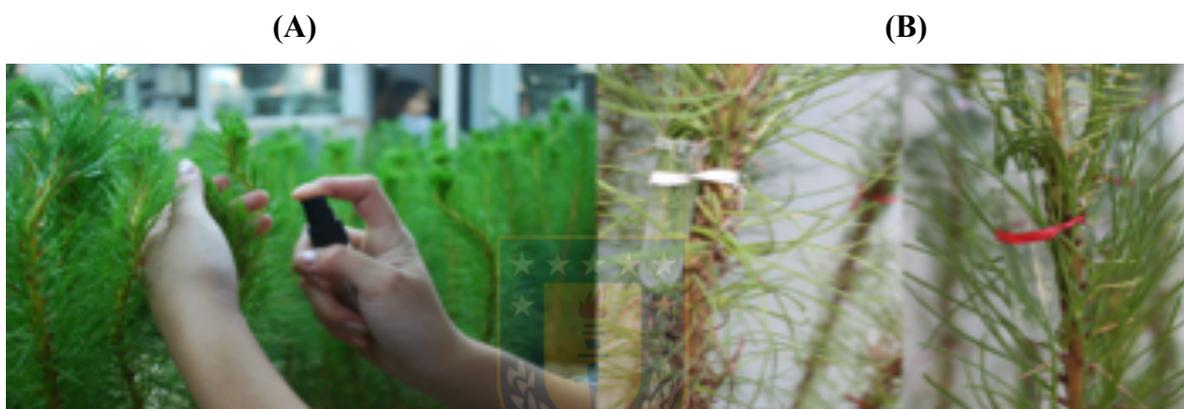
Para desarrollar el estudio se utilizaron las cepas de *P. pinifolia*: 63, 64, 75, 83 y 100. Para la producción de inóculo del patógeno, consistente en zoosporas, se utilizó un método desarrollado por el Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción. En este método, se utilizaron acículas de plántulas de *P. radiata* desinfestadas superficialmente con alcohol al 95 % y posteriormente lavadas tres veces con agua destilada estéril (ADE). Luego las acículas se cortaron por la mitad, y fueron dispuestas sobre colonias de *P. pinifolia* creciendo en medio de cultivo AZ, y mantenidas a 25 °C, en oscuridad, durante siete días (Figura 2). Como tratamiento testigo se utilizaron acículas con esterilización superficial dispuestas en discos de micelio de agar zanahoria sin inóculo del patógeno.



**Figura 2.** Producción de inóculo de *Phytophthora pinifolia*. Acículas de *Pinus radiata* dispuestas sobre colonias de *Phytophthora pinifolia*.

### 3.2 Prueba métodos de inoculación.

Se inocularon plantas de *P. radiata* (9 meses) con una concentración de inóculo de 10.000 zoosporas  $\text{ml}^{-1}$  de *P. pinifolia* mediante los dos métodos: Inoculación por aspersión e inoculación por inmersión (Figura 3) (Hansen *et al.* 2005). El método por aspersión consistió en aplicación directa del inóculo de *P. pinifolia* sobre los fascículos de *P. radiata*. El método de inmersión consistió en la disposición de fascículos de *P. radiata* en el interior de tubos Eppendorf de 2,0 ml, que contienen 1,5 ml de suspensión de inóculo. El tiempo de inoculación de los fascículos fue de 24 horas, para luego retirar el tubo Eppendorf. La concentración fue ajustada previamente mediante el uso de hematocitometro a 10.000 zoosporas/ml.



**Figura 3.** Muestra de métodos de inoculación de acículas de *Pinus radiata* con suspensión de zoosporas de *Phytophthora pinifolia*: Aspersión (A) y Inmersión (B).

### 3.3 Efecto de la cantidad de inóculo de *P. pinifolia* e infección en plantas de *P. radiata*

Las plantas fueron inoculadas tres cepas de *P. pinifolia* (85, 492 y 601), a cinco densidades de inóculo de: 0, 100, 1.000, 10.000 y 70.000 zoosporas  $\text{ml}^{-1}$ ; las que fueron obtenidas mediante el método descrito previamente (en el punto 3.2). Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron con mojamiento foliar permanente mediante riego por aspersión, fotoperiodo 12/12, humedad relativa entre 50-70% a temperatura de 10°C. Después de 15 días de la inoculación, fueron colectadas acículas los tubos Eppendorf, desinfectadas por 1 min en etanol 70%, tres lavados en ADE para luego ser sembradas a medio selectivo CMA-Antibiótico (Sanfuentes *et al.* 2012). Se inocularon 15 plantas por bandeja, con tres inoculaciones por planta considerando nueve acículas por cada tubo EPP. Al cabo de siete días, las colonias formadas fueron colectados fragmentos de micelio para ser identificado mediante biología molecular con el protocolo de PCR empleando el DFP2, método desarrollado en el

Laboratorio de Patología Forestal para la identificación de *P. pinifolia* (Kit axyprep genomic DNA (Axyprep multisource genomic DNA miniprep, Union City, CA, USA).

### **3.2.3 Efecto de la temperatura y mojamiento foliar en la infección**

Fueron inoculadas plantas de *P. radiata* (9 meses) con tres cepas de *P. pinifolia* (85, 492 y 601), a una concentración de inóculo de 10.000 zoosporas ml<sup>-1</sup>. Para este ensayo se utilizó la metodología de inmersión, descrito en el ensayo de métodos de inoculación (3.2). Se evaluaron cinco tiempos de mojamiento foliar; 6, 12, 18, 24, 48 horas, manteniendo condiciones controladas de fotoperiodo 12/12 y humedad relativa entre 50-70%. Se realizaron tres experimentos en forma independiente para tres temperaturas: 10, 15 y 25°C. Se utilizaron tres plantas por cada binomio tiempo de mojamiento/temperatura, con tres repeticiones por planta inoculada con nueve acículas por punto de inoculación. En el control las acículas fueron inmersas solo en ADE. La evaluación consistió en coleccionar todas las acículas de cada uno de los tres tubos Eppendorf, siendo desinfectadas por 1 min en etanol 70%, y tres lavados en ADE, para luego ser traspasadas a medio selectivo CMA-Antibiótico. Al cabo de siete días, se re-aislaron las colonias obtenidas para posteriormente, ser comprobados que el micelio aislado correspondía a *P. pinifolia* mediante biología molecular con el protocolo de PCR para identificación molecular de *P. pinifolia* con partidor DFP2, método desarrollado en el Laboratorio de Patología Forestal, UDEC, PCR (Kit axyprep genomic DNA (Axyprep multisource genomic DNA miniprep, Union City, CA, USA).

## **4. Análisis estadístico**

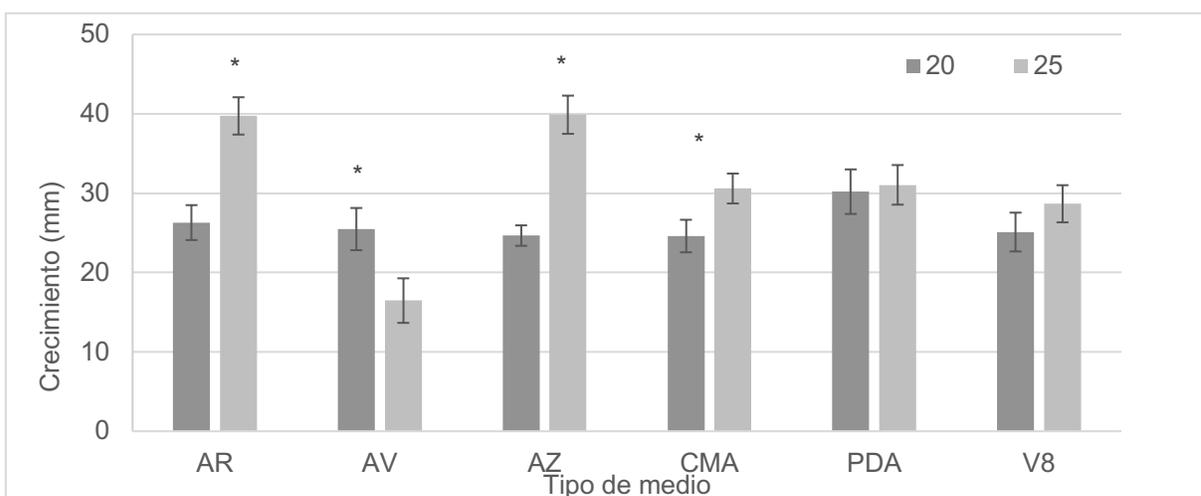
Para los estudios de efecto del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de *Phytophthora pinifolia*, cantidad de inóculo de *P. pinifolia* en infección de *P. radiata* y de la temperatura y mojamiento foliar en la infección, se utilizó el análisis de datos de medidas repetidas con moderación de la estructura de la varianza, mediante el software estadístico SAS, con diseño factorial temperatura–medio, temperatura cepa y temperatura– aislamiento. El estadístico de discriminación de medias utilizado fue la prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Efecto de del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de de *Phytophthora pinifolia*.

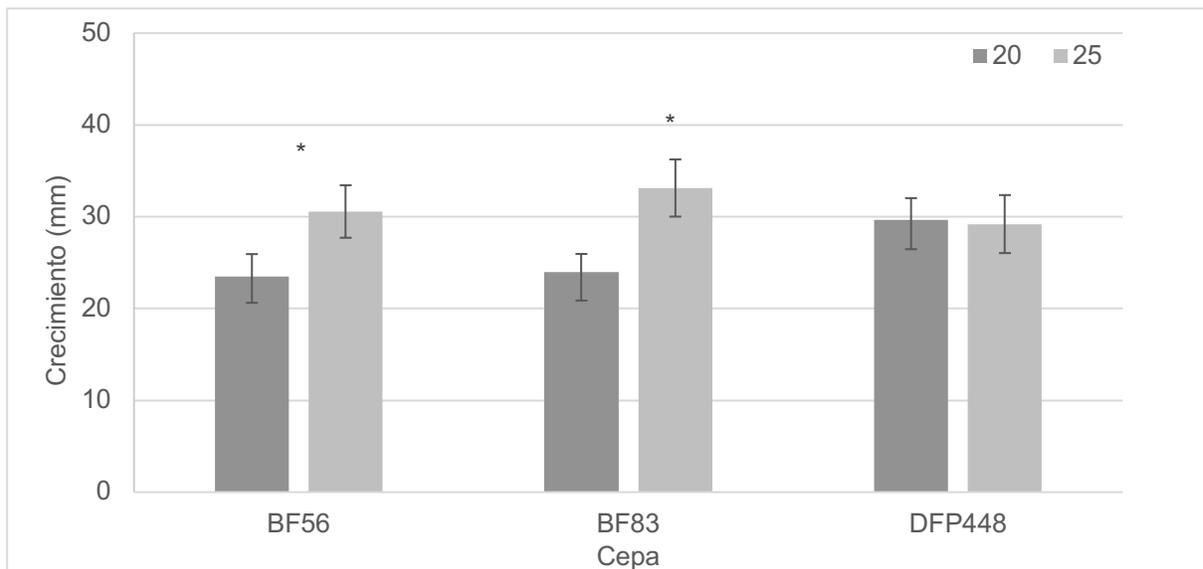
#### 1.1. Efecto del medio de cultivo y temperatura para el crecimiento de *P. pinifolia*

Según los datos obtenidos en el estudio existen diferencias significativas en el crecimiento micelial para las tres cepas de *P. pinifolia* fue en los medios AR y AZ a temperatura de 25°C (Figura 4). Este comportamiento sería similar para otras especies del clado 6 como son *P. gregata*, *P. taxon paludosa*, *P. gonapodyides*, *P. drechsleri* y *P. megasperma* las que poseen un óptimo de crecimiento micelial entre 22,5 a 25°C (Jung *et al.* 2011), y levemente superior al óptimo de *P. ramorum* y *P. infestans*, que fluctúa entre 20 y 23°C (Tooley *et al.* 2009; Rotem *et al.* 1970; Hüberli *et al.* 2012). En este ensayo, las cepas 56 y 83 presentaron diferencias significativas a 25°C, y en la cepa 448 no presento diferencia significativa para ambas temperaturas de crecimiento 20-25°C (Figura 5), lo que podría atribuirse a la procedencia de la cepa donde fueron aislado el patógeno que la temperatura máxima fluctúa de 20 a 25°C. Después de 30 días de incubación las colonias de *P. pinifolia* no cubrieron la superficie de la placa de Petri (10 cm de diámetro), alcanzando crecimiento promedio de 1 mm/día, indicando que *P. pinifolia* posee una menor tasa de crecimiento comparado con otras especies de *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro 1996).



**Figura 4.** Crecimiento de la colonia de *Phytophthora pinifolia* a temperaturas de incubación de 20 y 25 °C, en medios de cultivo: agar arveja (AR), agar avena (AV), agar zanahoria (AZ),

agar harina de maíz (CMA), agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz con jugo V8 (V8) y  $P < 0,05$  (\*).



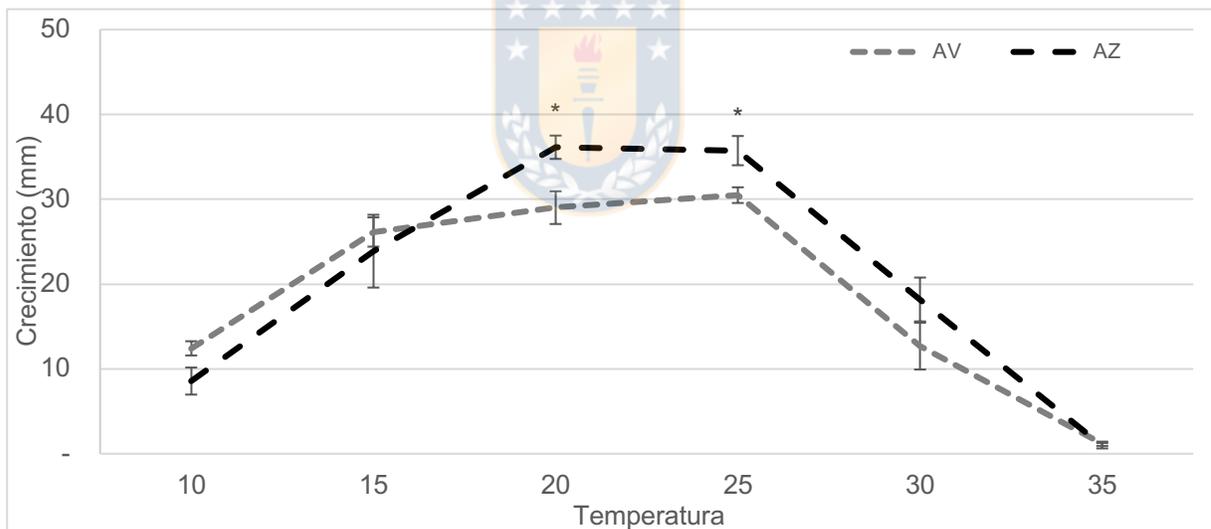
**Figura 5.** Crecimiento promedio de las colonias de *Phytophthora pinifolia* cepa 56, 83 y 448 a temperaturas de 20 y 25°C en medios de cultivo: agar arveja (AR), agar avena (AV), agar zanahoria (AZ), agar harina de maíz (CMA), agar papa dextrosa (PDA), agar harina de maíz con jugo V8 (V8) y  $P < 0,05$  (\*).

### 1.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento en diferentes aislados de *P. pinifolia*

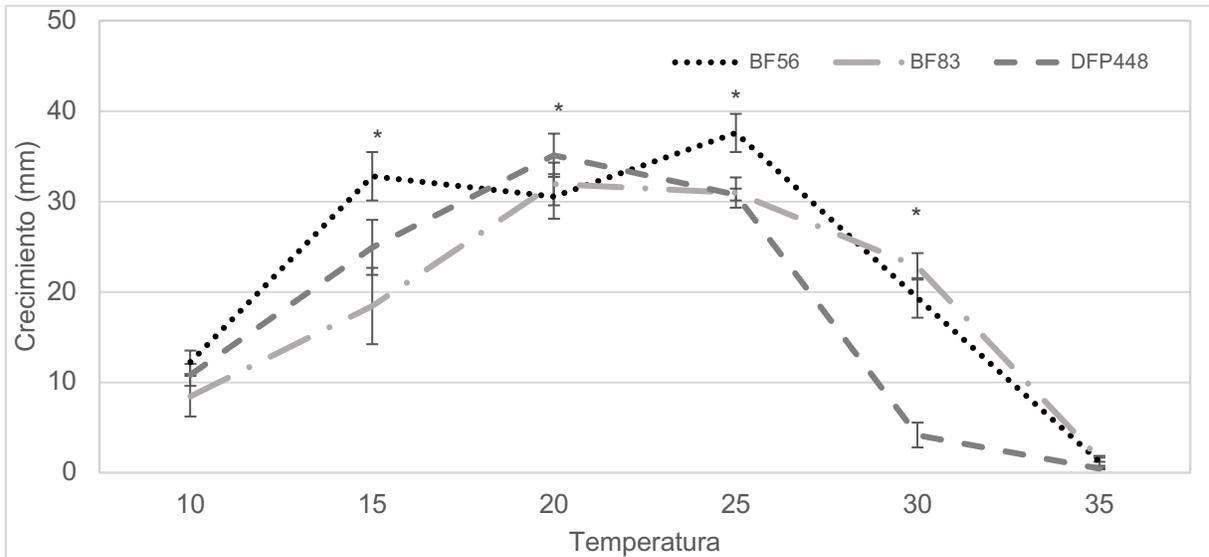
Las tres cepas de *P. pinifolia* presentaron crecimiento micelial en el rango de 10 a 30°C, y sin presentar crecimiento a 35°C. La temperatura óptima de crecimiento para *P. pinifolia* estuvo entre 20 y 25°C, aunque se verificó un mayor crecimiento en el medio AZ para 20 y 25 °C (Figura 6). Este óptimo de crecimiento podría estar relacionado con las temperaturas máxima en las zonas de ocurrencia del patógeno en Chile. Estudios con otras especies de *Phytophthora* que provocan enfermedades en especies forestales muestran diversos resultados. Jung *et al* el (2003), demostraron que la temperatura óptima de crecimiento para *P. pseudosyringae* es 20°C, sin crecimiento a sobre 27,5 a 30°C y creciendo lentamente en los medios de cultivo AV y V8. *Phytophthora* europea presenta un comportamiento similar al de *P. pseudosyringae* en temperatura óptima, mientras otras especies como *P. uliginosa* y *P. psychrophila* presentan menores temperaturas óptimas, fluctuando entre 15-17°C y 17-18°C, respectivamente (Jung *et al.* 2002). En el caso de *P. ramorum* su temperatura óptima de crecimiento es 20°C, sin embargo, esta óptimo puede variar según el aislado del patógeno, fluctuando entre 17 y 25°C (Werres *et al.* 2001) y entre

16 y 26°C para aislados colectados en Estados Unidos y Europa (Englander *et al.* 2006), resultados similares a los obtenidos para *P. pinifolia*, referido a la variabilidad en el rango de crecimiento que presentaron los aislados del patógeno (Figura 7) . Las tres cepas de *P. pinifolia* tuvieron un rango de crecimiento entre 10 a 30°C (Figura 7), similar a los rangos obtenidos por Englander *et al.* (2006) para *P. ramorum* y Sánchez *et al.* (2002) para *P. cinnamomi*. En estos estudios, otros medios de cultivo fueron utilizados, sin embargo, sólo se plantean diferencias morfológicas observadas en los aislados. La temperatura óptima para *P. pinifolia* es menor a del patógeno de raíces *P. cinnamomi* que es de 30°C (Sánchez *et al.* 2002) y mayor a la de *P. pluvialis*, causante de la banda roja de las acículas en *P. radiata* en Nueva Zelandia y que provoca síntomas similares a los de *P. pinifolia*, con n óptimo de crecimiento a 17°C (Dick *et al.* 2014).

Considerando a las especies de *Phytophthora* pertenecientes al clado 6 (Jung *et al.* 2011), *P. pinifolia* presenta similar patrón en el óptimo de crecimiento 25°C que *P. gonapodyides*, *P. megasperma*, *P. gregata*, *P. gibbosa* y *P. litoralis*.



**Figura 6.** Crecimiento micelial de *Phytophthora pinifolia* en medio agar avena (AV) y agar zanahoria (AZ) incubadas entre incubadas a 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C. (\*) P<0,05.



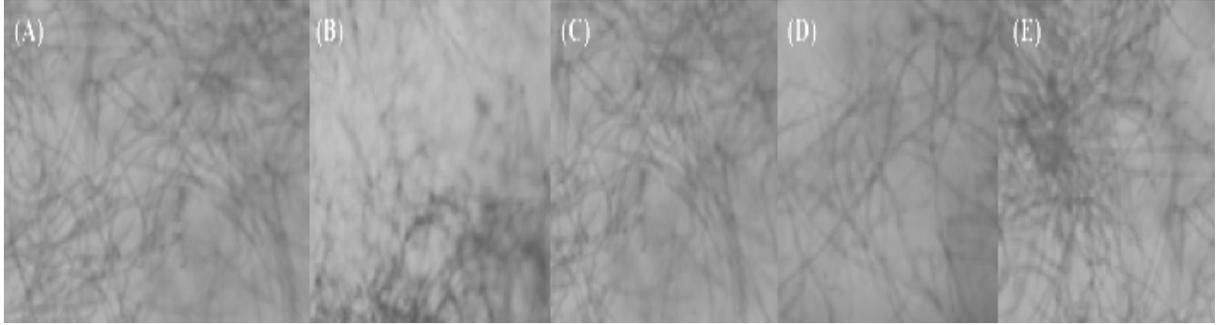
**Figura 7.** Crecimiento micelial de cepas *Phytophthora pinifolia* 56, 83 y 448, en medio agar avena (AV) y agar zanahoria (AZ) incubadas a 10, 15, 20, 25, 30 y 35 °C. (\*)  $P < 0,05$ .

## 2. Producción de estructuras reproductivas sexuales mediante apareamientos de cepas de *P. pinifolia* y con otras especies de *Phytophthora*.

### 2.1. Paramientos entre cepas de *P. pinifolia*

En los apareamientos in vitro entre los aislados de *P. pinifolia*, no se observó ningún tipo estructura reproductiva sexual en la zona de contacto de las colonias enfrentadas, tanto en las diferentes temperaturas como medios de cultivo probados (Figura 8). Estos resultados son coincidentes con un estudio previo probando varias cepas de *P. pinifolia* (Duran *et al.* 2008). Esta ausencia de reproducción sexual es un comportamiento característico de especies heterotálicas, como *P. ramorum*, que presenta dos tipos apareo (mating type), representado por dos líneas no emparentadas, la A1 presente en Europa y la A2 en Estados Unidos (Rizzo *et al.* 2005). En Chile, la especie *P. infestans* sólo se ha verificado tipo A1 (Mating type A1), y que implica una menor diversidad genética del patógeno (Acuña *et al.* 2007).

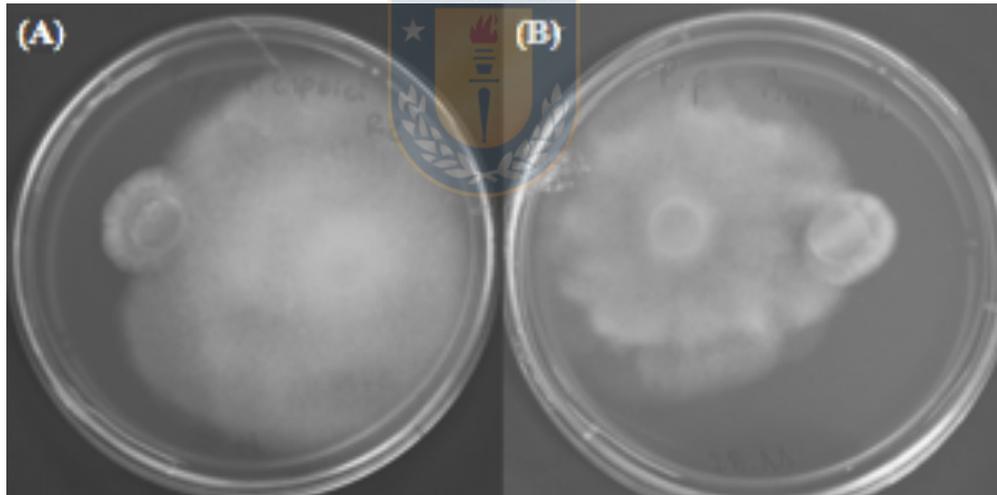
El estudio realizado por Duran *et al.* (2010) demostró que la población de *P. pinifolia* presente en Chile correspondería a dos genotipos similares, los cuales no presentaron estructuras sexuales al realizar pruebas de apareamientos. Una baja diversidad en especies de *Phytophthora* podría significar que corresponde a especies introducidas. Goodwin *et al.* (1993) demostraron a través de una recopilación de estudios, que en *P. infestans* en el lugar de origen de la enfermedad es posible encontrar una alta variabilidad de genotipos del patógeno, mientras que en lugares donde la especie es introducida, sólo se presentará unas pocas variaciones.



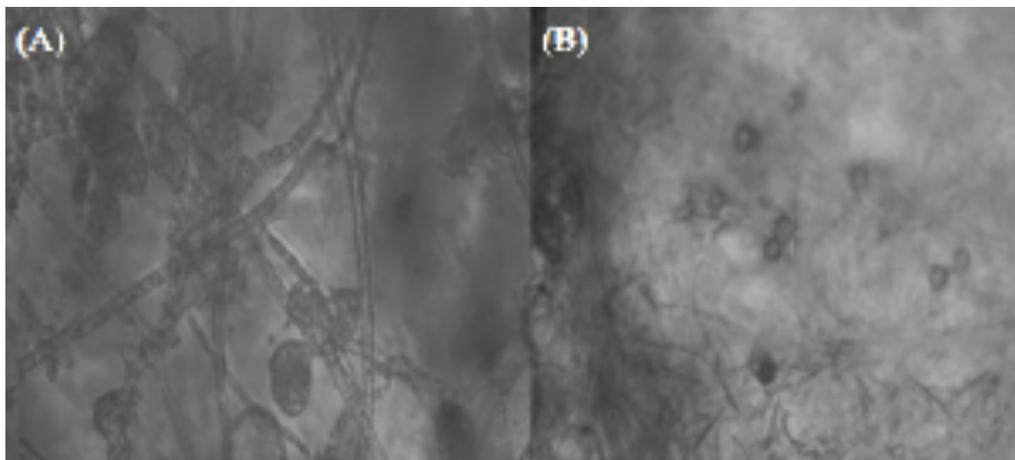
**Figura 8.** Micelio de aislados de *Phytophthora pinifolia* cultivados en diferentes medios de cultivo: AA (A), AZ (B), V8 10% (C), CMA (D) y PDA (E).

## 2.2. Paramientos con otras especies de *Phytophthora*

En los pareamientos efectuados entre *P. pinifolia* y otras especies de *Phytophthora* (Figura 9), solo se encontraron oosporas en el paramiento *P. pinifolia* x *P. megasperma*, oosporas fueron formadas por *P. megasperma*, debido a su condición de oomicete homotálico. En los pareamientos *P. pinifolia* x *P. cinnamomi*, se observó la formación de una gran cantidad de clamidosporas en el micelio formadas por la cepa de *P. cinnamomi* (Figura 10).



**Figura 9.** Pareamiento interespecifico *in vitro* entre aislados de *Phytophthora pinifolia* y otras especies de *Phytophthora*. *Phytophthora pinifolia* x *Phytophthora capsici* (A) y *Phytophthora pinifolia* x *Phytophthora megasperma* (B).

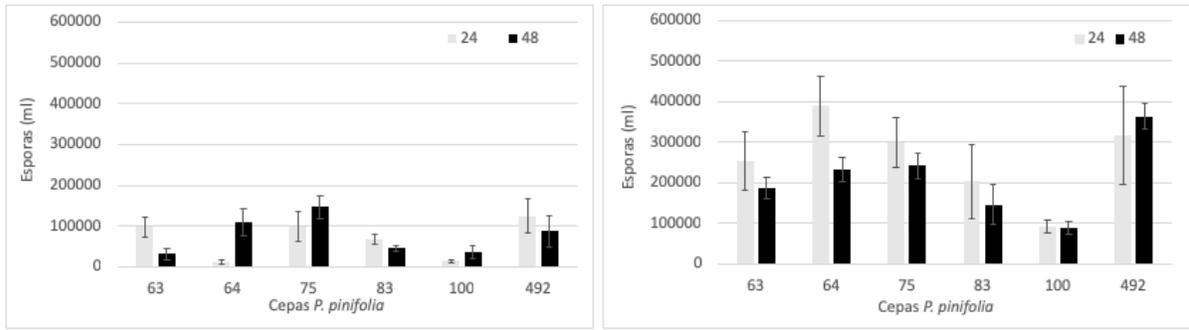


**Figura 10.** Pareamiento interespecífico entre aislados de *Phytophthora pinifolia* y otras especies de *Phytophthora*. *P. pinifolia* x *P. cinnamomi* (A), *P. pinifolia* x *P. megasperma* (B) (vista microscópica 100x).

### 3. Cantidad de inóculo de *P. pinifolia* para infectar plantas de *P. radiata*

#### 3.1. Producción de inóculo de *P. pinifolia*.

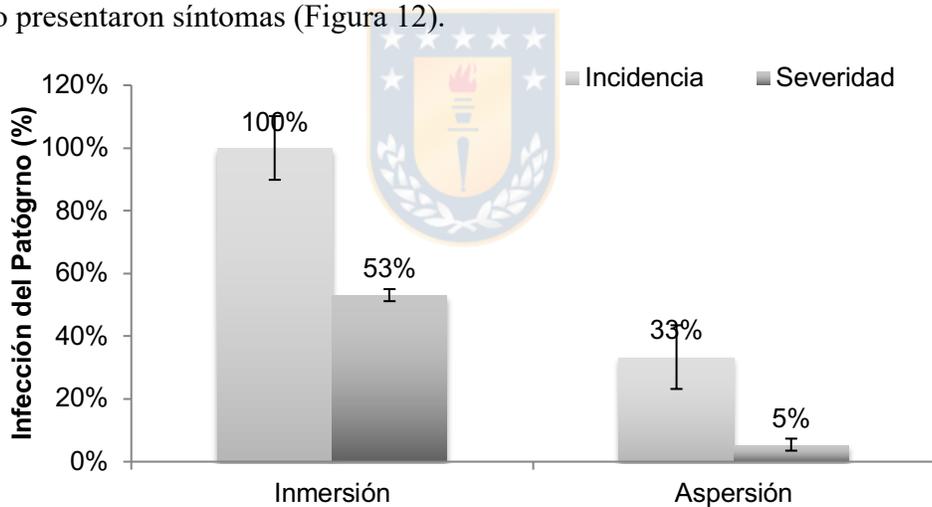
Los seis aislados de *P. pinifolia* produjeron zoosporas en condiciones *in vitro*, aunque no se verificaron diferencias significativas entre los tratamientos en tiempo de almacenamiento (24 o 48 horas). Las diferencias existieron entre los tiempos de incubación de las acículas en conjunto con el patógeno, generando una mayor cantidad de zoosporas en la incubación durante 8 días (Figura 11). Widmer *et al.* (2015) demostraron que se obtienen concentraciones entre 1 y 3 x 10<sup>5</sup> zoosporas/ml al incubar discos de 9 mm en medio AZ previamente sumergidos en caldo de zanahoria. Una vez incubado por 7 días, se realizó un barrido de la colonia, la cual se almacenó en incubadora a 20°C por 24 horas. Además, Widmer *et al.* (2015) indicaron que con este método no es necesaria la mantención de la suspensión de zoosporas en frío para la liberación de estas. Ahumada *et al.* 2012, 2013 produjeron zoosporas de *P. pinifolia* utilizando medio de cultivo V8 y luego incubar los discos de micelio en caldo V8, sin embargo, no es posible comparar ambos métodos, ya que no se expresan las concentraciones obtenidas mediante este método.



**Figura 11.** Producción de zoosporas de *Phytophthora pinifolia* en acículas de *Pinus radiata* inoculadas en colonias del patógeno, incubadas durante 4 y 8 días, a 25°C, en oscuridad y evaluadas después de 24 y 48 horas en ADE.

### 3.2. Método de Inoculación en plantas de *P. radiata*.

El método de inoculación de *P. pinifolia* que alcanzó mayor eficacia de infección fue mediante la inmersión de acículas, resultando en 100 % de infección en las plantas inoculadas con el patógeno, comparado con 33 % de infección en las plantas inoculadas por aspersión, plantas control no presentaron síntomas (Figura 12).

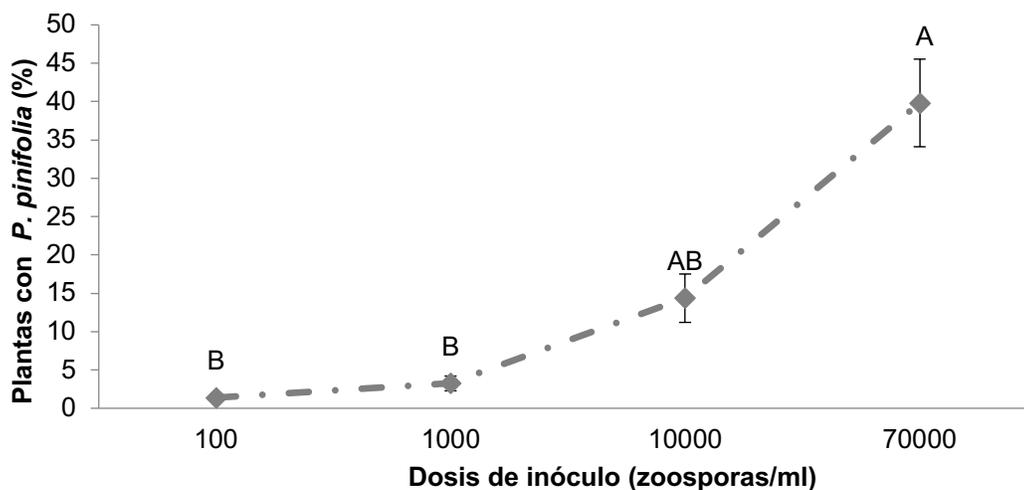


**Figura 12.** Método de inoculación de acículas de *Pinus radiata* con suspensión de zoosporas de *Phytophthora pinifolia* por medio de inmersión y aspersión.

### 3.3. Efecto de la cantidad de inóculo de *P. pinifolia* en infección de *P. radiata*.

La menor cantidad de inóculo probada (100 zoosporas ml<sup>-1</sup>) fue suficiente para causar infección en las acículas de *P. radiata*. Al aumentar el inóculo del patógeno a 1.000, 10.000 y 70.000 zoosporas ml<sup>-1</sup> se registró un aumento de la incidencia en 5%, 15% y 40%, respectivamente (Figura 13), entretanto las plantas control no presentaron síntomas. Widmer *et al.* (2015) inoculando 10.000, 50.000 y 100.000 zoosporas ml<sup>-1</sup> de *P. pinifolia* en acículas

de *P. radiata*, tuvieron una incidencia de síntomas entre 15 y 25%, entre 40 y 70% y entre 60 y 90%, respectivamente, resultados similares a los niveles de incidencia obtenidos en este estudio independiente de las temperaturas ensayadas (15, 20 y 25°C).



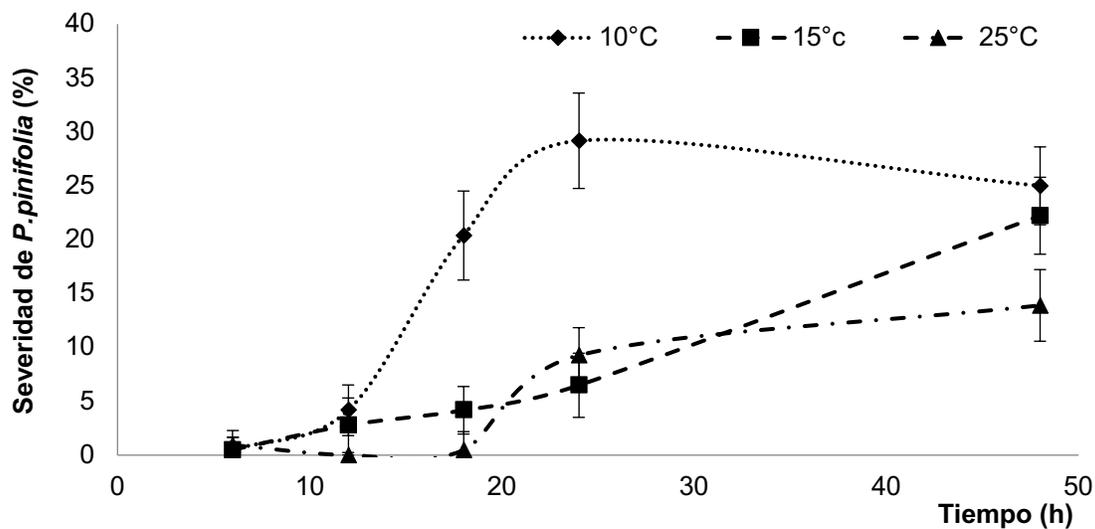
**Figura 13.** Infección en acículas de *Pinus radiata* (%) con diferentes cantidades zoosporas de *Phytophthora pinifolia*, en plantas mantenidas a 10°C. (A, B) letras diferentes implica diferencia significativa entre diferentes dosis de inoculación  $P < 0,05$  (\*).

### 3.4. Efecto de la temperatura y mojamiento foliar en la infección

Se presentó infección de *P. pinifolia* en acículas de *P. radiata* a partir de las primeras 6 h de inmersión (mojamiento foliar), en las tres temperaturas de incubación. A las 12 h aumentó la infección solo a 10 y 15°C. A las 24 h después de la inoculación se alcanzó el máximo de infección a 10°C, alcanzando cerca del 30%, entretanto a 15 y 25°C la infección en acículas fluctuaba entre 5-10%. Con inmersión de 48 h no existió diferencia entre los niveles de infección a 10 y 15°C, siendo mayor que a 25 °C (Figura 14). Las plantas control no presentaron síntomas. Duran *et al.* (2008) realizaron las primeras inoculaciones de *P. pinifolia* en plantas de *P. radiata*, utilizando la metodología de discos de micelio dispuestos en heridas en el tallo de las plantas, logrando lesiones de diversa magnitud y realizar el patógeno en las zonas necrosadas en donde se habían realizado las inoculaciones. Posteriormente, Ahumada *et al.* (2013) realizaron estas inoculaciones en 13 especie de *Pinus*, obteniendo lesiones de diversa magnitud en todas las especies analizadas. En este mismo estudio, se realizó una inmersión de las plantas durante 12 horas, para luego mantenerlas en condiciones de laboratorio y en campo, registrándose una incidencia del 77%. Estudios realizados con

inoculaciones de *P. pluvialis* en *P. radiata* mediante inmersión de acículas lograron replicar la sintomatología que se observa en terreno (Dick *et al.* 2014), sin embargo, al igual que los descritos por Ahumada *et al.* (2013) con los resultados de este estudio, es necesario realizar más pruebas para comprender las condiciones óptimas de la enfermedad. De acuerdo con Dick *et al.* (2014) la inmersión durante toda la noche del fascículo en una suspensión de zoosporas en las condiciones óptimas resulta fundamentales para la reproducción de los síntomas. Estas consideraciones se basan en las observaciones de la enfermedad en campo, donde, para *P. pluvialis*, las lesiones aparecen posterior a periodos continuos de lluvia y alta humedad. En el caso de *P. pinifolia*, la aparición de síntomas en campo comienza en invierno, cuando las temperaturas comienzan a disminuir entre los 6 y 12°C y durante periodos más prolongados de lluvias. Otros factores relevantes para la enfermedad serían humedad, agua libre y baja radiación UV (Durán *et al.* 2008).

Widmer *et al.* (2015) no encontraron diferencias significativas en la incidencia de *P. pinifolia* en la inoculación de plántulas de *P. radiata* manteniendo las plantas a 15, 20 y 25°C, obteniendo una incidencia de alrededor del 85%. En estos ensayos la inoculación se realizó mediante aspersión del patógeno, obteniendo mayores niveles de infección a los obtenidos con el mismo método en este estudio; sin embargo, las condiciones en las cuales se encontraban las plantas mantuvieron una humedad relativa constante de un 100%, lo cual influiría directamente en el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 14.** Número de acículas de *Pinus radiata* que presentaron *Phytophthora pinifolia* de acuerdo con diferentes tiempos de inmersión y temperaturas de incubación.

## CONCLUSIÓN

*P. pinifolia* tiene un amplio rango de crecimiento micelial entre 10 a 30°C, no creciendo a 35°C y con una temperatura óptima 20 a 25°C.

No se formaron estructuras reproductivas sexuales de *P. pinifolia* en las diferentes condiciones de medios de cultivo/temperatura y apareamientos inter e intraespecíficos probados.

La cantidad mínima de inóculo de *P. pinifolia* para causar infección en plantas de *P. radiata* fue de 100 zoosporas ml<sup>-1</sup>.

A medida que se incrementa el periodo de mojamiento aumenta la severidad de infección para *P. pinifolia* infectando a partir de 6 horas de mojamiento foliar, siendo mayor la infección a 10 °C.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

Acuña, I., Sagredo, B.; Bravo, R.; Gutiérrez, M., Maldonado, I., Gaete, N., Inostroza, J., Secor, G., Rivera, V., Kalazich, J., Solano, J., Rojas, J. 2007. Using a forecasting system to develop integrated pest management strategies for control of late blight in southern Chile. Tenth Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of potato late blight, Bologna, Italy.

Ahumada R. 2003. Pathogens in commercial Eucalyptus plantations in Chile, with special reference to *Mycosphaerella* and *Botryosphaeria* species. Pretoria, Sudáfrica: University of Pretoria, M.Sc. thesis.

Ahumada R., Díaz C., Peredo M., Barría C., González P., Cuevas, G. 2009. Evaluation of the occurrence of *Phytophthora pinifolia* in sawn wood from *Pinus radiata* in Chile. Bioforest S.A. and Gobierno de Chile, SAG, Concepción, Chile.

Ahumada R., Rotella A., Slippers B., Wingfield MJ. 2012. Potential of *P. pinifolia* to spread via sawn green lumber: a preliminary investigation. Southern Forests 2012, 74(4): 211–216.

Ahumada R.; Rotella A., Slippers B., Wingfield MJ. 2013. Pathogenicity and sporulation of *Phytophthora pinifolia* on *Pinus radiata* in Chile. Australian Plant Pathology, 42:413-420.

Aragaki M., R. D. Mobley, R.B. Hine. 1967. Sporangial Germination of *Phytophthora* from Papaya. Mycological Society of America. Vol. 59: 93-102.

Alexopoulos C, C. Mims, M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley & Sons Inc. Fourth Edition. University of Texas at Austin. Texas, United States. Plant Pathology 56, 227–241.

Agrios G. 2005. Plant Pathology. Academic Press. Fifth Edition. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States. Pp 19; 414 – 427.

Barnes I., Crous P.W., Wingfield M.J. y Wingfield B.D. 2004. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology* 50: 55-65.

Blair, J.E., M.D. Coffey, S.Y. Park, D.M. Geiser, S. Kang. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 45: 266–277.

Brasier C.M., Beales P.A., Kirk S.A., Denman S. and Rose, J. 2005. *Phytophthora kernoviae* sp.nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research* 109 (8): 853-859.

Brasier, C. M., Jung, T., 2006: Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. In: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees*. Proc. 3rd Int. IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Freising, Germany, September 11 – 17, 2004. Eds. Brasier, C. M.; Jung, T.; Osswald, W. Farnham, UK: Forest Research, pp. 5–16.

Brown, A., Brasier M., 2007; *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons Inc. Fourth Edition, *Phytophthora* species, *Plant Pathology* 56, 227–241.

Ciampi L. 2002. *Introducción a la Patología Vegetal*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Cooke D. E. L., A. Drenth, J.M. Duncan, G. Wagels, C.M. Brasier. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 30: 17–32.

Dick M.A., Dobbie K., Cooke D.E. and Brasier C.M. 2006. *Phytophthora captiosa* sp.nov. and *P.fallax* sp.nov. causing crown dieback of *Eucalyptus* in New Zealand. *Mycological Research* 110:393-404.

Dick M.A., Williams N., Bader M., Gardner, J., Bulman, L. 2014. Pathogenicity of *Phytophthora pluvialis* to *Pinus radiata* and its relation with red needle cast disease in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 44:6.

Duran A., M. Gryzenhout, A. Drenth, B. Slippers, R. Ahumada, B. D. Wingfield, M. Wingfield. 2010. AFLP analysis reveals a clonal population of *Phytophthora pinifolia* in Chile. *British Mycological society*, 114: 746-752.

Duran, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 2008. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology* 57: 715-727.

Elsevier. Department of Microbiology and Plant Pathology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria. South Africa. Vol. 114: 746-752.

Edwards K., Dunstan B., Giles E St J Hardy & Jung T. 2011. *Phytophthora* species associated with declining *Eucalyptus rudis* in the south-west of Western Australia. Murdoch University. State Centre of Excellence for Climate Change, Woodland and Forest Health. 17 pp.

Englander, L.; Browning, M. y Tooley, P. 2006. Growth and sporulation of *Phytophthora ramorum* in vitro in response to temperature and light. *Mycologia*, 98 (3): 365 - 373.

Erwin D, S. Bartnick-Garcia, P.H. Tsao. 1983. *Phytophthora*, It's Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. The American Phytopathological Society. ST Paul, United States. 392 pp.

Erwin D, O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, United States. 562 pp.

Fajardo, S., Valenzuela, S.; Dos Santos, A.; Gonzalez, M.; Sanfuentes, E. 2017. *Phytophthora pseudosyringae* associated with the mortality of *Nothofagus obliqua* in a pure stand in central-south of Chile. Forest Pathology 47:e12361.

Forest Phytophthora of the World. 2013. *Phytophthora* Basics. URL. <http://www.forestphytophthoras.org/phytophthora-basics>.

Frankel S. 2006. Sudden Oak Death and *Phytophthora ramorum* in the USA: a Management Challenge. USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Albany, CA, USA. Australian Plant Pathology Vol. 37: 19-27.

Frankel, S.J. y Hansen E.M. 2011 Forest *Phytophthora* diseases in the Americas: 2007 – 2010. New Zealand Journal of Forestry Science 41S (2011) S159-S167.

Goodwin, W., Dyer, A., Matuszak, J., Dreth, A., Tooley, P., Sujkowski, L., Koh, Y., Cohen, B., Spielman, L., Deahl, K., Inglis, D., Sandlan, K. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways and implications. Plant disease Vol 77 n°7, 653:661.

Guerrero P.C. y Bustamante R.O. 2007. Can native tree species regenerate in *Pinus radiata* plantations in Chile? Evidence from field and laboratory experiments. Forest Ecology and Management 253: 97–102.

Greslebin A.G. and Hansen E.M. (2010) Pathogenicity of *Phytophthora austrocedrae* on *Austrocedrus chilensis* and its relation with mal del ciprés in Patagonia. Plant Pathology 59, 604–612.

Grünwald N. J., Werres S., Goss E. M., Taylor C. R., Fieland V. J. 2012. *Phytophthora obscura* sp. nov., a new species of the novel *Phytophthora* subclade 8d. Plant Pathology 61(3):610-622.

Hansen, E., Parke, J., Sutton, W. 2005. Susceptibility of Oregon Forest Trees and Shrubs to *Phytophthora ramorum*: A comparison of Artificial Inoculation and Natural Infection. Plant disease, Vol 89, pp. 63-70.

Hüberli D, Hayden K. J, Calver M, Garbelotto M, 2012. Intraspecific variation in host susceptibility and climatic factors mediate epidemics of sudden oak death in western US forests. Plant Pathology 61, 579–592.

Instituto Forestal (INFOR). 2018. El sector Forestal en Chile 2018. Santiago, Chile. 48 pp.

Jung, T., Hansen, E., Winton, L., Obwald, W., Delatour, C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. Mycologi research, 106 (4): 397-411.

Jung T., J. Nechwatal, D.E. Cooke, G. Hartmann, M. Blaschke, W.F. Osswald, J.M. Duncan, C. Delatour. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. Bavarian State Institute of Forestry (LWF), Section Forest Ecology and Forest Protection, Freising, Germany. Mycol Res. Vol. 107:772-789.

Lanfranco, D. 2000. Manejo de plagas forestales en Chile: análisis de casos en *Pinus radiata*. Série Técnica IPEF 13: 41–8.

Maseko B, Burgess TI, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2007. Two new *Phytophthora* species from South African Eucalyptus plantations. Mycological Research 111: 1321-1338.

McPherson B.A, Wood D.L., Storer A.J., Svihra P., Rizzo D.M., Kelly N.M. and Standiford R.B. 2000. Oak Mortality Syndrome: Sudden Death of Oaks and Tanoaks. TREE NOTES. Department of Forestry and Fire Protection. N° 26, Agosto 2000.

Newman Luz E., S.D. Midlei Silva, J. Bezerra, J.T. de Souza, A. dos Santos. 2008. Illustrated Glossary of *Phytophthora*. Itabuna, Bahia, Brazil. 140 pp.

Parke J., Oh E., Voelker S., Hansen E., Buckles G., Lachenbruch B., 2007. *Phytophthora ramorum* Colonizes Tanoak Xylem and Is Associated with Reduced Stem Water Transport. Oregon. Phytopathology Vol. 97: 1558-1567.

Phytosanitary Measures. 2011. 43rd Meeting of the Panel on Phytosanitary Measures (EPPO Headquarters, Paris, 2011-04-05/08).

Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W. and Koike, S. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. Plant Disease. 86: 205-214.

Rizzo, D., Garbelotto, M., Hansen, E. 2005. *Phytophthora ramorum*: Integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon Forests. Annual Rev. Phytopathology, 43: 309-335.

Rotem J, Cohen Y, Putter J, 1970. Relativity of limiting and optimum inoculum loads, wetting durations and temperatures for infection by *Phytophthora infestans*. Phytopathology 61, 275-278.

Sánchez, M., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A. *Phytophthora* diseases of *Quercus ilex* in south-western Spain. Forest Pathology 32, 5-18.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, CL). 2007. Daño Foliar del Pino. 3 p. Consulted: [26/09/09]. Available on <http://www.sag.gob.cl/>.

Sanfuentes, E., Gonzalez, G., Casanova-Kany A., Valenzuela S. 2012. Proyecto Innova Bío Bío código 08-PCS1-445, “Epidemiología del daño foliar del pino (DFP) y ciclo biológico de *P. pinifolia*: bases para una estrategia de control integrado”. Concepción Chile, 164 pp.

Sanfuentes, E., Fajardo, S., Sabag, M., Hansen, E., González, M. 2016. *Phytophthora kernoviae* isolated from fallen leaves of *Drymis winteris* in native forest of southern Chile. Australian Plant Disease Notes, 11:19.

Sansford, C. 2012. Revised Rapid Assessment of the need for a detailed Pest Risk Analysis for *Phytophthora pseudosyringae*. The Food and Environment Research Agency, FERA, Sand Hutton, UK.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2004. Identificación de nuevo hongo en follaje de *Pinus radiata*. Servicio Agrícola y Ganadero, División Protección agrícola, Sub Depto., Vigilancia y control oficial fitosanitario, Unidad Vigilancia Forestal Gobierno de Chile. 1 pp.

Scott P.M., Burgess T.I., Barber P.A., Shearer B.L., Stukely M.J.C., Hardy G.E.St.J. and Jung T. 2009. *Phytophthora multivora* sp.nov., a new species recovered from declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and other plant species in Western Australia. Persoonia 22:1-13.

Timmer, L.W, Zitko S. E, Gottwald, T. R, and Graham, J. H. 2000. *Phytophthora* brown rot of citrus: Temperature and moisture effects on infection, sporangium production, and dispersal. Plant Dis. 84:157-163.

Tooley, P. W., Browning, M., Kyde, K. L., and Berner, D. 2009. Effect of temperature and moisture period on infection of *Rhododendron* 'Cunningham's White' by *Phytophthora ramorum*. Phytopathology 99:1045-1052.

Waterhouse G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K. Vol. 92: 22 pp.

Werres, S.; Marwitz, R.; Veld, W.; M de Coock, A.; Bonants, P.; Weerdt, M.; Themann, K.; Ilieva, E. y Baayen, R. 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. Mycologi Research, 105 (10), pp 1155 - 1165.

Widmer, T., Dodge, S. 2015. Bioassays conditions for infection of *Pinus radiata* seedlings with *Phytophthora pinifolia* zoospores. Plant disease Vol. 99 n°9, 1204:1209.

Wingfield M. 2007. A new species of *Phytophthora* associated with dying pine needles in Chile. Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria. Pretoria, South Africa. 3 pp.

Zentmyer G., Klure L. y Pond, E. 1979. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia, Vol. 71, No. , pp 55-67.

