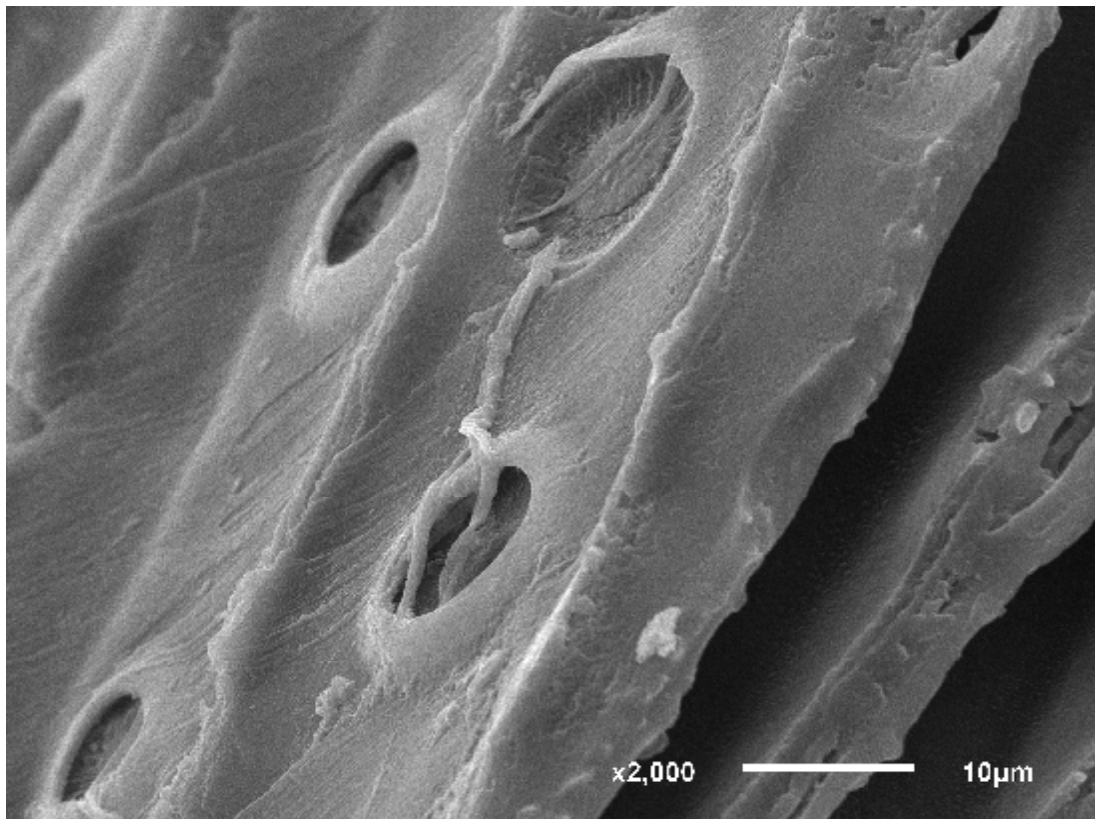




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Sede Esquel

Histología de la afección de *Phytophthora austrocedri*
en los tejidos de conducción de *Austrocedrus chilensis*



Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Ing. Ftal. Oscar Alberto TRONCOSO

Director: Dra. Alina GRESLEBIN
Co Director: Dra. Beatriz GALATI

2017

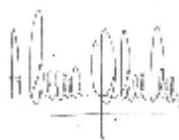
Tesis:

Histología de la afección de *Phytophthora austrocedri* en los tejidos de conducción de *Austrocedrus chilensis*



Doctorando
Ing. Ftal. Oscar Troncoso

Firma y Aclaración



Directora
Dra. Alina Greslebin

Firma y Aclaración



Co-Directora
Dra. Beatriz Galati

Firma y Aclaración

*A la memoria de mis padres, Ibelio y Antonia
quienes siempre me inculcaron estudiar*

Agradecimientos

A mi familia por el apoyo incondicional y contención en los momentos difíciles que tuve que sortear durante el presente estudio....Gracias!

A mi directora Dra. Alina Greslebin, por la paciencia, el acompañamiento, por ayudarme a crecer como profesional, y por estar siempre al tanto de todo!

A mi co-directora Dra. Beatriz Galati por su rapidez y eficiencia en los aportes, correcciones y sugerencias; por su entendimiento y palabras de aliento en los momentos difíciles que tuve que enfrentar

A la Facultad de Ciencias Naturales y Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, y al Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), por el apoyo económico y logístico para el desarrollo de este proyecto

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (MEByM) del IANIGLA- CONICET-Mendoza: Fidel, Silvina, Federico y Enrique (“Quique”), por la ayuda recibida durante los trabajos que realicé allí y por la generosidad, cordialidad, amabilidad con la cual siempre me recibieron

A todos los revisores anónimos (y no tan anónimos), que enriquecieron este trabajo

A Malau por su colaboración en la traducción

A todos mis compañeros de trabajo y personal tanto de la Universidad como del CIEFAP que de alguna u otra manera, me ayudaron y colaboraron desinteresadamente en este proyecto

A todos muchas gracias !!!

CAPITULO I

RESUMEN

El "Ciprés de la Cordillera" [*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri] es una conífera nativa del Bosque Subantártico de Chile y Argentina, que pertenece a la familia de las Cupresáceas (subfamilia Callitroideae tribu Libocedreae). Su área de distribución se encuentra a ambos lados de la Cordillera de los Andes, entre Neuquén y Chubut del lado argentino. Desde un punto de vista económico reviste gran importancia por la calidad de su madera, muy apreciada tanto para la construcción como para la fabricación de muebles. Mientras que ecológicamente tiene un alto valor porque es una especie capaz de formar bosques en la zona ecotonal y adentrarse en la estepa. Sin embargo, esta importancia ecológica y socioeconómica se ve afectada, en gran parte, por una enfermedad asociada a esta especie desde hace varios años. La mortalidad, que se observa en muchos lugares a lo largo del bosque de *A. chilensis*, ha sido denominada "mal del ciprés" (MDC), y se identificó a la especie *Phytophthora austrocedri* como causante primario de la misma. El signo principal causado por *P. austrocedri* en árboles naturalmente infectados es una lesión necrótica que se extiende desde las raíces muertas hacia el tronco, pudiendo alcanzar hasta 1 metro de altura por encima del suelo. La necrosis afecta al cambium, al floema y a la albura. Los cambios y alteraciones de los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri* en el ciprés de la cordillera, como así también el desarrollo del patógeno en dichos tejidos, son aspectos fundamentales para el entendimiento de la histopatología y fisiopatología de la enfermedad. En esta investigación, se seleccionaron árboles infectados naturalmente y se inocularon artificialmente árboles jóvenes con *P. austrocedri* para el estudio de los tejidos de conducción los cuales fueron analizados y descritos con diferentes técnicas de microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (MEB). Se analizaron y describieron las alteraciones, daños y/o deformaciones celulares y funcionales producidas por el patógeno, como así también se relacionaron las alteraciones observadas con posibles mecanismos de defensa y con la sintomatología del MDC. Se determinó que el primer tejido afectado por el patógeno es el cambium vascular, con una necrosis general del mismo que luego se extiende al floema y por último afecta al xilema. La reprogramación de las células cambiales origina canales resiníferos traumáticos, bolsones de resina en el floema, deformación de radios y traqueidas, y producción de trabéculas en elementos conductores del xilema, como posible mecanismo de defensa inducido. Dentro de las modificaciones químicas se observó una mayor acumulación de compuestos fenólicos en células parenquimáticas y fibras del floema, y una translocación y/o disminución del contenido de almidón en los radios xilemático y células subsidiarias de los canales resiníferos. La producción de resina fungistática de los canales resiníferos traumáticos es considerada también como una respuesta química del árbol frente al ataque del patógeno. Por otra parte se registró el mecanismo de desarrollo de *P. austrocedri* en ambos tejidos de conducción. Los resultados alcanzados en el presente estudio permitieron proponer el primer modelo histológico de la afección y desarrollo de *P. austrocedri* en los tejidos de conducción del ciprés y relacionarlo con la sintomatología de la enfermedad. A pesar de ello, los mecanismos por los cuales se desencadenan estas diferentes respuestas en los tejidos de conducción frente al ataque fúngico son aún desconocidos. El modelo histológico aquí planteado será de gran utilidad para conocer y comprender estos mecanismos de defensa, y los de resistencia natural frente a este patógeno, y de esta forma avanzar en la formulación de productos y metodologías concretas para el control de la enfermedad.

SUMMARY

“Ciprés de la Cordillera” [*Austrocedrus chilensis* (D.Don) Pic. Ser. et Bizzarri] is a native conifer of Subantarctic forests of Argentina and Chile, and belongs to Cupresáceas family (subfamily Callitroideae tribu Libocedreae). Its distribution area is located on both sides of the Andean Cordillera, between Neuquén and Chubut provinces on the Argentinean side. It is very important from the economical point of view due to its wood quality, which is very appreciated for building proposes as well as for furniture manufacture. It has also a high ecological value since this species can form forests in the ecotonal region going into the steppe. However, the ecological as well as the socio-economical importance is being affected, mostly because of a disease which affects this species since many years ago. The mortality, which can be observed in many sites along *A. chilensis* forests, has been named as “mal del ciprés” (MDC), and the pathogen *Phytophthora austrocedri* has been identified as being the primary cause of the disease. The main sign caused by *P. austrocedri* in naturally infected trees is a necrotic lesion extending from dead roots up to the bole, and which may reach up to 1 meter high above the ground. Necrosis affects the cambium, the phloem and the sapwood. Changes and alterations in conductive tissues affected by *P. austrocedri* in ciprés de la cordillera, as well as the development of the pathogen in such tissues constitute fundamental aspects to understand the histopathology and fisiopatogeny of the disease. In this research, naturally infected trees and young trees artificially inoculated by *P. austrocedri*, were selected in order to study conductive tissues which were analyzed and described using different techniques of optical microscopy (MO) and scanning electron microscopy (SEM). Alterations, damage and/or cell deformation or functional changes produced by the pathogen were analyzed and described, and the observed alterations were related with possible defense mechanisms and with the MDC symptomatology. It was determined that the first tissue affected by the pathogen is the vascular cambium, with a general necrosis which later extends to the phloem and then affects the xylem. Reprogramation of cambial cells originates traumatic resin canals, resin pockets in the phloem, ratio and tracheid deformation and trabeculae production in conductive elements of the xylem, as a possible induced defense mechanism. Among the chemical modifications, a greater accumulation of phenolic compounds was observed in parenchymal cells and phloem fibers, as well as a translocation and/or starch content decrease in xylematic ratios and subsidiary cells of the resin canals. Fungistatic resin production of the traumatic resin canals is also considered a chemical response of the tree against the pathogen attack. Besides, the mechanism by which *P. austrocedri* develops in both conductive tissues was registered. The results achieved in the present study allowed to propose the first histological model of the affection and development of *P. austrocedri* in ciprés conductive tissues, and relate it to the symptomatology of the disease. In spite of this, the mechanisms underlying the different responses that are triggered in the conductive tissues by the fungal attack remain unknown. The here proposed histological model will be very useful to unravel these defense mechanisms as well as those related to the natural resistance against this pathogen, which may lead to make progress in the formulation of specific products and methodologies to control the disease.

Tabla de contenido

CAPITULO I	5
RESUMEN.....	5
SUMMARY	6
CAPITULO II	11
INTRODUCCIÓN.....	11
CAPITULO III	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
HIPOTESIS	23
PREDICCIÓN.....	23
CAPITULO IV.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
OBTENCION DE MUESTRAS	24
<i>Árboles jóvenes infectados artificialmente</i>	24
<i>Árboles adultos enfermos naturalmente</i>	26
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO	29
<i>Para árboles jóvenes inoculados artificialmente</i>	29
<i>Para árboles adultos infectados naturalmente</i>	29
Técnicas para la Microscopía Óptica.....	30
Técnicas para los Análisis Histoquímicos	31
Detección de almidón	31
Detección de fenoles	31
Detección de taninos	31
Detección de lignina.....	32
<i>Técnica para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)</i>	32
CAPITULO V	34
RESULTADOS.....	34
NECROSIS DEL CAMBIUM Y DEL FLOEMA.....	35

Cambium y floema sano	35
Cambium y floema afectado.....	36
FORMACIÓN DE CANALES RESINÍFEROS TRAUMÁTICOS Y BOLSONES DE RESINA	42
ANÁLISIS HISTOQUÍMICO	44
<i>Detección de almidón</i>	44
<i>Detección de compuestos fenólicos</i>	47
<i>Detección de taninos</i>	52
<i>Detección de lignina</i>	55
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	58
ALTERACIONES DEL XILEMA DE <i>Austrocedrus chilensis</i> AFECTADO POR <i>Phytophthora austrocedri</i>	62
FORMACION DE TRABÉCULAS	63
DEFORMACIONES DE RADIOS Y TRAQUEIDAS.....	67
ANÁLISIS HISTOQUÍMICO	69
<i>Detección de almidón</i>	69
<i>Detección de compuestos fenólicos</i>	70
<i>Detección de taninos</i>	70
<i>Detección de lignina</i>	70
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	72
MECANISMO DE DESARROLLO DE <i>Phytophthora austrocedri</i> DENTRO DEL FLOEMA DE <i>Austrocedrus chilensis</i>	73
PRESENCIA DEL PATÓGENO EN EL FLOEMA.....	74
MECANISMO DE DESARROLLO DE <i>Phytophthora austrocedri</i> EN EL XILEMA DE <i>Austrocedrus chilensis</i>	85
PRESENCIA DEL PATÓGENO EN EL XILEMA.....	86
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.....	88
CAPITULO VI.....	92
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	92
CAPÍTULO VII.....	105
CONCLUSIONES.....	105
CAPITULO VIII.....	112
BIBLIOGRAFIA.....	112

Índice de figuras

Figura 1: Bosque de <i>Austrocedrus chilensis</i> , “Ciprés de la Cordillera”	11
Figura 2: Distribución natural de <i>Austrocedrus chilensis</i>	12
Figura 3: Procedimiento de inoculación de árboles jóvenes	25
Figura 4: Ubicación del bosque en estudio	27
Figura 5: Vista general del bosque en estudio	27
Figura 6: Extracción de muestras en árboles adultos	28
Figura 7: Selección de muestras en árboles jóvenes inoculados artificialmente	29
Figura 8: Selección de muestras en árboles adultos	30
Figura 9: Acondicionamiento de muestras para MEB	33
Figura 10: Sección transversal de tallo de planta sana joven, sin tinción	36
Figura 11: Necrosis generalizada del cambium, sin tinción	37
Figura 12: Necrosis general del cambium y floema, sin tinción	39
Figura 13: Diferencia floema sano y afectado, tinción azul de algodón	40
Figura 14: Necrosis general del cambium y floema árboles adultos, tinción azul de algodón	41
Figura 15: Formación de canales resiníferos traumáticos en árboles jóvenes	43
Figura 16: Formación de canales resiníferos traumáticos y bolsones de resinas en árboles adultos	44
Figura 17: Detección de almidón en planta sana e inoculada	45
Figura 18: Acumulación y pérdida de almidón en planta inoculada	46
Figura 19: Detección de fenoles en planta sana	48
Figura 20: Detección de fenoles en planta inoculada	49
Figura 21: Presencia de fenoles en fibras y células parenquimáticas	50
Figura 22: Detección de fenoles en árboles adultos	51
Figura 23: Detección de taninos en planta sana e inoculada	53
Figura 24: Detección de taninos en planta inoculada	54
Figura 25: Detección de taninos en árboles adultos	55
Figura 26: Detección de lignina en planta sana e inoculada	56
Figura 27: Detección de lignina en floema de planta inoculada	57
Figura 28: Detección de lignina en árboles adultos	58
Figura 29: MEB necrosis del cambium en planta joven inoculada	59
Figura 30: MEB deformación células del floema y cambium planta joven inoculada	60

Figura 31: MEB formación canales resiníferos traumáticos en planta joven inoculada	61
Figura 32: Alineación de trabéculas simples cortas y largas en leño tardío y temprano	64
Figura 33: Alineaciones de trabéculas simples largas en leño tardío y temprano	65
Figura 34: Alineaciones de trabéculas dobles, triples y en forma de placa	66
Figura 35: Deformaciones de radios y traqueidas	68
Figura 36: Detección de almidón en xilema	69
Figura 37: Detección de fenoles, compuestos tánicos y lignina en xilema	71
Figura 38: MEB formación de canales resiníferos traumáticos en árboles adultos	72
Figura 39: Hifas de <i>P. austrocedri</i> en células cribosas	75
Figura 40: Hifas de <i>P. austrocedri</i> en células parenquimáticas	76
Figura 41: Hifas y oosporas en canales resiníferos traumáticos	77
Figura 42: MEB ensanchamientos hifales y clamidospora	78
Figura 43: MEB hifas en tejido floemático	79
Figura 44: MEB avance de hifas por áreas cribosas	80
Figura 45: MEB hifas en canales resiníferos traumáticos	81
Figura 46: MEB detalle de hifas embebidas en resina	82
Figura 47: MEB formación de “puentes” hifales en canales resiníferos	83
Figura 48: MEB desarrollo de hifas y ensanchamientos hifales en canales resiníferos	84
Figura 49: <i>P. austrocedri</i> en el xilema	86
Figura 50: Desarrollo de hifas dentro de traqueidas	87
Figura 51: Formación de “puentes” hifales entre puntuaciones areoladas	88
Figura 52: MEB paso de hifas a través del margo de la membrana de las puntuaciones areoladas	89
Figura 53: MEB desarrollo de hifas en radios parenquimáticos	90
Figura 54: MO y MEB presencia de clamidospora	91
Figura 55: Modelo histológico de afección de <i>P. austrocedri</i> en el floema y xilema	107
Figura 56: Modelo de desarrollo y colonización de <i>P. austrocedri</i>	110

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

El "Ciprés de la Cordillera" [*Austrocedrus chilensis* (D.Don) Pic. Ser. et Bizzarri] es una conífera nativa del Bosque Subantártico de Chile y Argentina (Fig.1); que pertenece a la familia de las Cupresáceas (subfamilia *Callitroideae* tribu *Libocedreae*). Es una especie dioica cuyos polen y semillas se dispersan por el viento (Pastorino et al. 2006). Es un árbol de gran porte, por lo general entre 20 y 25 m de altura, con tronco recto de 30 a 50 cm de diámetro. Excepcionalmente alcanza los 37 m de altura y 1,5 m de diámetro. Tiene copa de forma piramidal, compacta, con las ramillas dispuestas en un solo plano. El follaje es persistente, con hojas pequeñas escamiformes, dimorfas, provistas de bandas estomáticas. Presenta conos coriáceos y pequeños, compuestos de dos pares de escamas subleñosas. Algunos ejemplares impresionan por la robustez del tronco comparativamente con la copa (Erize, 1997).



Figura 1. Bosques de *Austrocedrus chilensis*, Ciprés de la Cordillera, zona cordillerana de la Patagonia Argentina.

El área de distribución del "Ciprés de la Cordillera" (Fig. 2) se encuentra a ambos lados de la Cordillera de los Andes, y está constituida por una serie de parches boscosos de variadas dimensiones distribuidos en un amplio rango latitudinal. La superficie que ocupan suma unas 141.000 ha en la Argentina y unas 47.157 ha en Chile (CONAF, 2011). La aparición más septentrional en la vertiente oriental, o del

lado argentino, del Ciprés de la Cordillera ocurre al norte de la Provincia de Neuquén, a los 37°7' LS y 73°36' W. El extremo austral de distribución de la especie se encuentra en la provincia de Chubut a 43°44' S y 71°23' W (Pastorino et al. 2006).

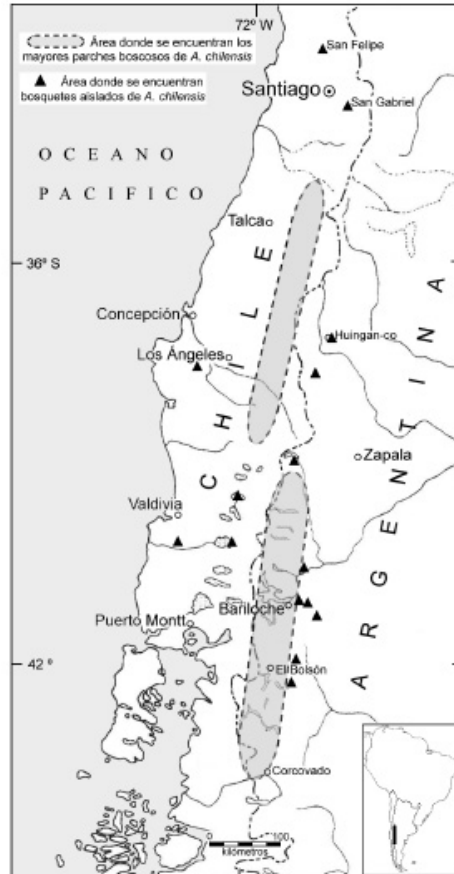


Figura. 2. Distribución natural de *Austrocedrus chilensis* (Pastorino et al. 2006)

Las características principales de la madera del Ciprés de la Cordillera en nuestro país han sido estudiadas por Tortorelli (1956), en sus aspectos tanto macroscópicos como microscópicos. Sus recientes actualizaciones (Tortorelli, 2009) describen la madera del ciprés con grano derecho, textura fina y homogénea, albura blanco-crema, duramen castaño claro a castaño ocre, peso específico de $0,460\text{kg/dm}^3$, diseño floreado en sección tangencial y rayado en sección radial; estas características y sus propiedades tecnológicas (Martinuzzi, 2008) hacen del ciprés una madera muy preciada para sus variados usos (carpintería, puertas, ventanas, pisos, tejuelas, tirantería, revestimientos, muebles, artesanías, postes, etc).

Desde el punto de vista anatómico, el tejido xilemático se caracteriza por tener traqueidas y parénquima axial difuso escaso, campos de cruzamiento tipo cupressoides con un promedio de 2 puntaciones por campo. El sistema de radios parenquimáticos es uniseriado, homocelular y el número promedio de células de alto por radio es 5, algunas células con depósitos de contenidos coloreados (Díaz-Vaz, 1985; Roig, 1992; Guerra et al. 1994). Ocasionalmente presenta trabéculas en elementos conductores (Roig, 1992), lo cual se considera una característica no excluyente (García et al. 2004). Las trabéculas son estructuras intracelulares que atraviesan el lumen celular en dirección radial desde una pared tangencial a la otra (Yumoto, 1984; Grosser, 1986; Richter et al. 2004). Se pueden encontrar dos tipos básicos diferentes: 1) en forma de "varillas" (tipo varilla), y 2) en forma de "placas" (tipo placa) (Grosser, 1986). A menudo se ven asociadas con anomalías estructurales y, por lo tanto, algunos autores sugirieron que no son una característica normal, sino más bien el resultado de una perturbación causada al cambium (Raatz, 1892; Schneiders, 1938 citado por von-Müller- Stoll, 1965; Keith, 1971).

El floema del ciprés presenta células cribosas, parénquima axial y radial, y fibras dispuestas en filas tangenciales regulares. Cada fila de células de parénquima axial tiene siempre a ambos lados una fila de las células cribosas. Estas filas compuestas (células cribosas – parénquima - células cribosas) están separadas entre sí por una fila de fibras. Este patrón regular se mantiene en el floema que conduce, pero se pierde gradualmente hacia el floema no conductor. Este último se caracteriza por un aumento del tamaño de las células del parénquima radial y axial y por la presencia de canales resiníferos dispuestos en forma aislada. Los compuestos tánico-resinosos marrones están presentes principalmente en células alargadas del parénquima axial, que aumentan hacia la periferia. Estos compuestos permanecen en las capas del ritidoma (De Magistris y Castro, 2001; Castro, 2009).

Desde un punto de vista económico, esta especie reviste gran importancia por la calidad de su madera, muy apreciada tanto para la construcción como para la fabricación de muebles. Ecológicamente tiene un alto valor porque, al ser una

especie capaz de formar bosques en la zona ecotonal y adentrarse en la estepa, constituye una barrera contra la desertificación y hábitat para muchas especies.

La función ecológica y socioeconómica que poseen los bosques de Ciprés de la Cordillera sobre la vertiente oriental de los Andes, así como su alta plasticidad, le otorgan a la especie un lugar preponderante entre las coníferas nativas de los Bosques Subantárticos (Gallo et al. 2005)

Sin embargo, esta importancia ecológica y socioeconómica se ve afectada en gran parte, por una enfermedad asociada a esta especie desde hace varios años.

Niveles altos de mortalidad de *A. chilensis* fueron reportados en 1948 en Isla Victoria (Parque Nacional Nahuel Huapi). En 1953, un caso similar fue observado en un bosque joven cercano a la localidad de Epuypén (Chubut) a unos 150 km de distancia. Desde entonces, la mortalidad se ha observado en muchos lugares a lo largo del bosque de *A. chilensis* y ha sido denominada “mal del ciprés” (MDC). La sintomatología observada en los bosques afectados presenta las siguientes características: decoloración del follaje y posterior defoliación, aunque ésta no siempre es inmediata. Estos procesos se hacen más evidentes durante el verano, estación del año de mayor sequía. La distribución y el avance de la defoliación responden a diferentes patrones. El más característico es el que ocurre en forma centrífuga y acrópeta, por lo que queda desnuda en primer término la porción basal de las ramas. También se observa resinación y pudrición en los troncos; ésta última es originada en las raíces (Havrylenko et al. 1989; Greslebin y Hansen, 2010). Los árboles pueden morir rápidamente, en este caso el follaje cambia de clorótico al rojo; o lentamente, la clorosis es seguida por la defoliación progresiva que lleva a la muerte del árbol después de varios años (Filip y Rosso, 1999).

Puesto que los síntomas comienzan en las raíces, que la enfermedad se asocia a sitios mal drenados (La Manna y Rajchenberg, 2004), y presenta una distribución en forma agregada (Rosso et al. 1994); se centró la atención en la acción posible de un patógeno pitiáceo. Así, se identificó a la especie *Phytophthora austrocedri* Gresl. & E.M. Hansen (sinónimo *Phytophthora austrocedrae*) como causante primario de la enfermedad. El signo principal causado por *P. austrocedri* en

árboles naturalmente infectados es una lesión necrótica que se extiende desde las raíces muertas hacia el tronco, pudiendo alcanzar hasta 1 metro de altura por encima del suelo. La necrosis afecta al cambium, floema y superficialmente a la albura. Las lesiones activas son marrones, brillantes y húmedas y flexibles; mientras que las inactivas son marrón oscuro, secas y duras, difícil de distinguir de la corteza (Greslebin y Hansen, 2010). La exudación de resina se asocia a menudo con lesiones de *P. austrocedri*. El flujo de la resina emerge generalmente de un bolsón de resina en el floema, cerca de la margen de una de una lesión necrótica activa.

Varias especies de *Phytophthora* se han aislado de diferentes sitios afectados por la enfermedad (Greslebin et al. 2005), pero solamente una, *P. austrocedri*, se ha aislado de tejidos necróticos de las raíces y del cuello de la raíz (Greslebin et al. 2007). La evidencia de bajos niveles de diversidad genética de *P. austrocedri* en la Patagonia, junto con su agresividad y patrón de progresión de la enfermedad, sugieren que esta especie podría haberse introducido en la Argentina (Velez et al, 2013). En febrero de 2012 se confirmó la presencia de *P. austrocedri* infectando *Juniperus communis* en Escocia (Green et al, 2015). Estudios preliminares indican una alta susceptibilidad de *Fitzroya cupressoides* y *Pilgerodendron uviferum* a este patógeno (Velez et al, 2014). A causa de su participación potencial en la etiología del MDC, la patogenicidad de *P. austrocedri* en *Austrocedrus chilensis* fue determinada, como así también su presencia en bosques afectados por la enfermedad (Greslebin y Hansen, 2010). Sin embargo, no existen estudios sobre la histopatogenia de la enfermedad y sobre desarrollo del patógeno en los tejidos de conducción del árbol. El estudio de la acción del patógeno en el floema y en el xilema, podría explicar algunas sintomatologías como la defoliación y el exudado de resinas y brindar información sobre cómo se muere el árbol y los posibles mecanismos de defensa asociados a esta enfermedad de origen fúngico (Blanchette y Biggs 1992).

Existen algunos antecedentes de estudios relacionados a la histopatogenia de enfermedades causadas por otras especies del género *Phytophthora*. Parke et al. (2007), describen la presencia de *P. ramorum* en la albura de árboles de encinas del género *Lithocarpus* (*L. densiflorus*). En este caso, el patógeno fue asociado

fuertemente a la decoloración de la albura y una gran cantidad de hifas se encontraron en los vasos del xilema, radios parenquimáticos y fibrotraqueidas. Los estudios de inoculación en el leño indican que *P. ramorum* coloniza rápidamente la albura desde el lugar del inóculo y se extiende tanto en sentido radial como axial en este tejido. El crecimiento a través de los vasos (elementos no vivos) proporciona al patógeno una "autopista" para una rápida propagación vertical dentro del árbol, facilitando el acceso a fuentes de alimentos, como las células parenquimáticas vivas cercanas. También se detectó mayor abundancia de tilosis en los árboles infectados que en árboles no infectados y se observaron clamidosporas consistentes con la descripción de especies de *P. ramorum* en los vasos del xilema. Los autores sugieren que el transporte de agua en los árboles infectados se redujo por obstrucciones causadas por las hifas, clamidosporas, tílides y probablemente embolias producidas en los vasos. La colonización del xilema por *P. ramorum* redujo el transporte de agua en el fuste, lo que sugiere una base fisiológica para la muerte repentina en esta especie de roble.

Oh y Hansen (2007) describieron la infección y colonización de *Phytophthora lateralis* en *Chamaecyparis lawsoniana*, que ocasiona la muerte radical. En los tallos, las hifas de *P. lateralis* crecen inter e intracelularmente en todas las células del floema secundario excepto en las fibras, y se concentran en las células parenquimáticas. Los cambios citológicos encontrados fueron núcleos dañados y citoplasmas desintegrados. Estructuralmente observaron espesamientos de la pared celular, células colapsadas, cuerpos secretores y depósitos de cristales en la pared celular. La infección de *P. lateralis* en los árboles de *Chamaecyparis lawsoniana*, sigue caminos similares a los descritos para *Phytophthora* spp. en otras especies arbóreas.

Brown y Brasier (2007) demostraron que *Phytophthora* spp. pueden aislarse regularmente del xilema decolorado que subyace a las lesiones del floema en los tallos de una amplia gama de árboles afectados; contrastando con la opinión comúnmente sostenida de que las lesiones causadas por *Phytophthora* en el vástago tienden a estar confinadas al floema y a las capas cambiales. Una cuestión pendiente es si *Phytophthora* spp. penetran y colonizan los vasos de

xilema lignificados o si la ocupación del tejido del xilema se limita principalmente a las células del parénquima vivo de los radios y a las células del parénquima axial. La propagación y penetración de *Phytophthora* spp. en el xilema puede darle un mayor potencial de supervivencia y la capacidad de romper y colonizar el floema sano en otras partes del tronco.

En los estudios histológicos en ramas de *Rhododendron* sp. inoculadas con *Phytophthora ramorum* (Pogoda y Werres, 2004) se detectaron hifas en todos los tejidos excepto en el cambium, el floema primario y la epidermis. La mayoría de las hifas estaban presentes en los vasos del xilema secundario y sólo algunas en el floema secundario. El crecimiento hifal fue inter e intracelular en la médula y el parénquima cortical; mientras que en el resto de los tejidos crecieron principalmente en forma intracelular. Los resultados de estos estudios histológicos mostraron también que *P. ramorum* desarrolla clamidosporas como esporas de reposo en tallos de rododendro.

Por otra parte, estudios de *Phytophthora cinnamomi* comprobaron que invade rápidamente el xilema y floema, a partir de una infección en éste último tejido tanto en *Eucalyptus marginata* como en *Pinus radiata* (Davison et al. 1994). La invasión del patógeno en el xilema del eucalipto, quedó confinada a una banda estrecha adyacente al cambium, mientras que en madera de pino la invasión en sentido radial (radios parenquimáticos) fue mucho más extensa. En los ensayos y experimentos, la invasión del patógeno fue restringida por diferentes mecanismos de respuesta como lo fueron para el caso del *E. marginata*, la formación de barreras de parénquima traumático cercanas al cambium con acumulación de polifenoles, segregación de kinos y tilosis, entre otros. Para el caso del *P. radiata*, las alteraciones encontradas responden a la no conducción en sentido axial, segregación de resinas y la presencia de traqueidas con puntuaciones aspiradas.

En un estudio sobre el efecto del patógeno *P. austrocedri* sobre la fisiología de *Austrocedrus chilensis* en plantas jóvenes inoculadas artificialmente (Vélez et al. 2012), se encontró que las hifas eran abundantes en el parénquima radial del xilema y en traqueidas. A partir de este hallazgo se postuló que el patógeno accede a la albura a través de radios procedentes de los tejidos de la corteza, y

que el bloqueo de las puntuaciones y del lumen de la traqueidas, junto con abundante acumulación de material resinoso en las mismas, causan la alteración de la conductibilidad hidráulica del tronco provocando la sintomatología característica.

Ante la presencia de un patógeno, las plantas ponen en marcha una serie de mecanismos para resistir la infección, controlar el crecimiento del patógeno y evitar el desarrollo de la patología. En las coníferas las defensas contra insectos y patógenos pueden ser clasificadas como constitutivas o inducidas (Franceschi et al. 2005). El sistema de defensa constitutivo incluye células y canales de acumulación de resina en el floema y xilema, células en el floema que almacenan sustancias tóxicas (por ejemplo, compuestos fenólicos) y propiedades mecánicas de la corteza tales como capas de células suberizadas y lignificadas, células pétreas y cristales de oxalato de calcio. El sistema de defensa inducido implica la síntesis *de novo* o la activación de una amplia gama de productos químicos de defensa, incluyendo terpenoides, fenólicos, proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) y enzimas. El sistema de defensa inducido puede actuar contra una infección del momento (respuesta hipersensible y resistencia local) o contra futuras infecciones o ataques (resistencia adquirida). Los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia adquirida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge et al. 1994). Es sabido que frente a la presencia de algún tipo de patógeno las plantas y principalmente las especies leñosas (árboles), generan algún mecanismo de defensa. La activación de esta defensa supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta identifica la presencia del patógeno (Madriz Ordeñaña, 2002). La aparición de lesiones locales necróticas en el sitio de la infección, son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (HR). La reacción hipersensible está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, fenoles, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR (Ryals et al. 1996).

Los patógenos de plantas pueden dividirse en tres clases en general, como biótrofos, hemibiótrofos y necrótrofos. Muchas especies de *Phytophthora* son patógenos hemibiótrofos con una fase biotrófica inicial durante la infección temprana seguido de una colonización necrotrófica en el tejido del hospedante. Cuando los patógenos biótrofos invaden las células del hospedante desarrollan estructuras intracelulares denominadas haustorios, a fin de facilitar la absorción de nutrientes a partir de la matriz extrahaustorial circundante. (Dodds et al. 2009, Leborgne-Castel et al. 2010). Los haustorios no se observan siempre en todas las interacciones (Oh & Hansen 2007, Jung et al. 2013), indicando que no todas las especies de *Phytophthora* son hemibiotróficas. Los patógenos necrótrofos, se nutren a partir de tejido muerto o que está en proceso de necrosis. Producen necrosis mediante la secreción de fitotoxinas, elicitores o enzimas, los que inician la lisis celular, facilitando el crecimiento y la reproducción del patógeno (van Kan 2006). La respuesta de defensa contra necrótrofos suele ser regulada por la activación de la vía del ácido jasmónico (JA)-etileno (Anderson et al. 2005, Koorneef & Pieterse 2008).

Las respuestas de resistencia a *Phytophthora* pueden ser específicas de hospedante o no, dependiendo de las especies. La resistencia específica de hospedante implica una respuesta rápida de defensa que incluye la respuesta hipersensible (HR), la muerte celular localizada en el sitio de ingreso del patógeno y la subsecuente resistencia sistémica adquirida (SAR) asociada con la acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión de genes dependientes de SA (Glazebrook 2005, Anderson et al. 2005, Chisolm et al. 2006). Mientras que la resistencia no específica de hospedante involucra una primera línea de defensa constituida por la pared celular y metabolitos antimicrobianos secundarios denominados fitoanticipinas. Entre los componentes celulares, son de importancia en la respuesta los compuestos fenólicos, la lignina y la calosa (Osbourn 2001, Slusarenko & Schlaich 2003, Nürnberger & Lipka 2005, van Loon et al. 2006). Si el patógeno supera esta primera línea se induce una respuesta de defensa en la que se producen fitoalexinas y especies reactivas del oxígeno, se activan múltiples cascadas de señalización y se expresan numerosos genes de resistencia (Mysore & Riu 2004). A pesar de las diferencias, existen similitudes entre los dos tipos de resistencia, en ambos casos se observa HR, así como la

deposición de calosa, lignina, la producción de peróxido de hidrogeno y SAR (Mysore & Riu 2004).

En estudios previos realizados se observó que *P. austrocedri* desencadena una respuesta de tipo hipersensible en hoja de *A. chilensis*, lejos del sitio de inoculación en tallo, aunque el mecanismo por el que la desencadena es desconocido (Vélez et al. 2012). Estudios recientes evidenciaron un perfil de componentes de resina diferencial en arboles afectados, con diterpenos que se inducen en situación de enfermedad (Olate et al. 2015). Además, en los estudios histológicos de floema de árboles enfermos se observó formación de canales resiníferos traumáticos, un fenómeno que ha sido relacionado a la activación de la vía JA-etileno en coníferas (Martin et al. 2002, Hudgins et al. 2004, Krokene et al. 2008, Troncoso et al. 2014). Esta vía también está involucrada en la inducción de síntesis de terpenoides de la resina (Martin et al. 2002). Por otra parte, en estudios acerca de la utilidad de fungicidas sistémicos como controladores de la enfermedad, se encontró que el fungicida Fosetyl-AI fue efectivo en el control de la enfermedad en plantas de vivero aplicado en el suelo y en árboles adultos a campo aplicado mediante inyección. Las evidencias indicaron que el mecanismo de protección del Fosetyl-AI contra el patógeno, además de un efecto fungistático sobre *P. austrocedri*, implicaría la inducción de una respuesta sistémica adquirida en la planta, aunque el mecanismo no ha sido elucidado (Silva et al. 2015).

Existe evidencia que indica que la producción de etileno inducida por el ácido jasmónico es responsable de la reprogramación de la zona cambial para la formación de canales resiníferos traumáticos (Hudgins y Franceschi, 2004; Hudgins et al. 2004). Además, los canales traumáticos pueden impartir resistencia adquirida a un posterior ataque (Christiansen et al. 1999; Krokene et al. 2003), a través de cambios en los componentes de terpenoides o por la adición de compuestos fenólicos, lo que vuelve a la resina más tóxica (Nagy et al. 2000; Olate et al. 2015).

Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. Nagy et al. (2000), en sus trabajos en Pinaceae, observó una reacción

hipersensible caracterizada por la muerte celular local y el aumento de células del parénquima axial ricas en polifenoles; además de células de radios y traqueidas deformadas. Estas características anatómicas son una respuesta en el sitio dañado, conformando una “zona de barrera” para proteger las nuevas células. Las zonas de barrera deben ser consideradas cuando se estudia la etiología del desarrollo de síntomas en el caso de enfermedades vasculares (Tippett y Shigo, 1981). También la formación de canales resiníferos traumáticos en varias coníferas es inducida por el daño o por el ataque de patógenos en el tronco, ubicándose por encima o debajo de dicho sitio (Ito, 1998; Franceschi et al. 2000; Nagy et al. 2000; Hudgins y Franceschi, 2004; Hudgins et al. 2004; Krekling et al. 2004). Estos canales se disponen por lo general en series tangenciales de una o dos filas dentro de un anillo anual del xilema (Thomson y Sifton 1926; Bannan, 1936).

Se ha señalado que la acumulación de fenoles cercana al sitio de penetración es una evidencia del desencadenamiento de la respuesta defensiva en las plantas y se ha descrito como uno de los eventos moleculares más importantes del proceso defensivo ante el ataque por patógenos (Walters et al. 2005). Además, los compuestos fenólicos se inducen en la mayoría de los tejidos vegetales como respuesta de defensa en la interacción con el patógeno y, al igual que la lignina, son tóxicos para los patógenos (Basha et al. 2006), y su polimerización hace a la pared celular más gruesa y fuerte (Ferreira et al. 2007). Existen antecedentes que vinculan, como sistema de defensa inducido, la formación y acumulación de compuestos fenólicos.

Se ha observado que se produce un aumento en las concentraciones de compuestos secundarios (especialmente fenólicos), en los márgenes de la lesión de muchas especies de árboles leñosos, y generalmente se considera que están implicadas en la protección contra plagas y enfermedades (Hart y Hillis, 1974; Woodward y Pearce, 1988; Evensen et al. 2000, Viiri et al. 2001, Eyles et al. 2003, Bonello y Blodgett, 2003, Blodgett et al. 2007). Ockels et al. (2007) en sus resultados de bioensayo confirmaron la toxicidad del tirosol contra *Phytophthora* spp., incluyendo *P. ramorum*; e indican que el ácido gálico también tiene actividad antimicrobiana siendo posible que ambos compuestos tengan actividad sinérgica.

Smith et al. (2007) mediante la aplicación de técnicas de histoquímica indicaron que en lesiones de plantas de *Eucalyptus globulus* (susceptible) y *Eucalyptus nitens* (resistente) infectadas naturalmente con *Mycosphaerella* spp., ocurrieron deposiciones de lignina en las paredes celulares, las cuales se incrementaron a medida que evolucionaron los síntomas y fueron mayores en el genotipo resistente. Se ha demostrado en otros patosistemas, que después que ocurre la infección por parte del patógeno, la planta responde rápidamente mediante la acumulación de fitoalexinas en el sitio de penetración y produce lignina y otros productos con el fin de frenar su expansión. Esto evidencia el papel de la lignificación de las células en el incremento de la resistencia en la planta frente al ataque fúngico (Ferreira et al. 2007). Otras defensas constitutivas e inducibles en la corteza de coníferas que involucran polifenoles, son las células del parénquima polifenólicas, denominadas “células PP” (Krekling et al. 2000); que juegan un papel destacado en la defensa contra patógenos necrotróficos. Aparte de sus compuestos fenólicos almacenados, las células PP muestran durante el ataque, un aumento sustancial tanto en la cantidad de células como en sus contenidos fenólicos (Franceschi et al. 1998, 2000; Evensen et al. 2000; Nagy et al. 2000, 2004; Krekling et al. 2004).

La falta de estudios específicos sobre los cambios y alteraciones de los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri* en el ciprés de la cordillera, como así también el desarrollo del patógeno en dichos tejidos, son aspectos fundamentales para el entendimiento de la histopatología de la enfermedad.

El presente trabajo estudia los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri*, analiza y describe las alteraciones, daños y/o malformaciones estructurales y funcionales producidas por el patógeno, como así también relaciona las alteraciones observadas con posibles mecanismos de defensa y con la sintomatología del “Mal del Ciprés”.

CAPITULO III

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de *Phytophthora austrocedri* en la patología del ciprés de la cordillera y de la respuesta defensiva del árbol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Estudiar y describir los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri*.
- b) Analizar y describir las alteraciones, daños y/o malformaciones estructurales y funcionales producidas por el patógeno.
- c) Relacionar las alteraciones observadas con la sintomatología del “Mal del Ciprés” y con posibles respuestas defensivas

HIPOTESIS

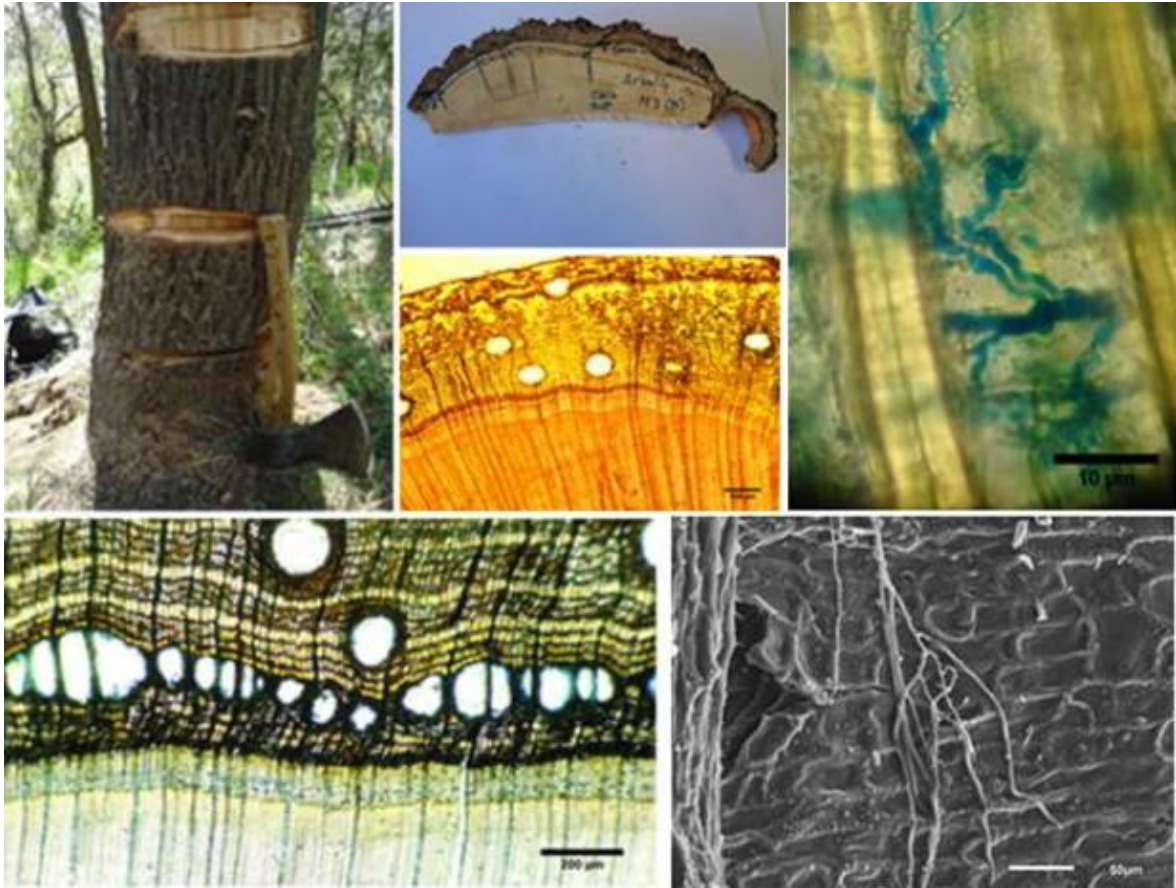
- 1) La infección y colonización de los tejidos de conducción del hospedante por parte del patógeno *Phytophthora*, genera alteraciones debidas a la acción del patógeno y a la respuesta del hospedante
- 2) El estudio de los tejidos de conducción afectados permite determinar la forma de acción del patógeno e inferir los mecanismos de respuesta del hospedante

PREDICCIÓN

El estudio de los tejidos de conducción de *A. chilensis* afectados por *P. austrocedri* evidenciará las alteraciones producidas por el patógeno y por la respuesta del árbol, permitiendo inferir los mecanismos involucrados.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS



OBTENCION DE MUESTRAS

Árboles jóvenes infectados artificialmente

Se seleccionaron seis (6) plantas de entre 8 y 12 años de edad, producidas por el vivero de la Unidad de Propagación Vegetal del Instituto de Biotecnología Esquel (INBIES) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco para ser inoculadas artificialmente con *P. austrocedri* y estudiar el desarrollo de la lesión en el tallo. Para inocular los tallos se utilizó la cepa Phy-271, obtenida a partir de

una lesión necrótica en árbol de ciprés adulto de un rodal afectado en la localidad de Corcovado (Chubut). La cepa se cultivó en medio multivitamínico V8 (Greslebin et al 2007). Se removió asépticamente una porción de corteza y se colocó un disco de agar con micelio obtenido del margen de crecimiento activo de la colonia. Se cubrió la zona con la corteza removida, con film plástico y papel de aluminio (Fig.3a-c). El mismo tratamiento se realizó sobre el control que recibió discos sin infectar.



Figura 3. Procedimiento de inoculación en árboles jóvenes de *Austrocedrus chilensis* de 8 años con *Phytophthora austrocedri*. **(a)** Colocación de disco de agar con micelio de *P. austrocedri*, aislamiento 271. **(b)** y **(c)** Protección y acondicionamiento de la zona inoculada, con recubrimiento de papel aluminio y film plástico.

Las plantas se mantuvieron en condiciones ambientales naturales (al exterior) por el término de 2 meses. Al finalizar el ensayo se removieron porciones de corteza a distancias regulares desde el punto de inoculación hasta encontrar una zona sana. Se extrajo completamente la porción de tallo que contenía la lesión y la porción sana adyacente al margen de la misma.

En todas las muestras se determinó la presencia/ausencia de *P. austrocedri* mediante aislamiento en medio selectivo PAR (Greslebin et al. 2007) y/o inmuno ensayo ELISA (DAS ELISA, ADGIA Inc.)

Para los controles de plantas jóvenes sanas, se seleccionaron 3 ejemplares entre 3 a 5 años de edad, producidos también por el vivero de la Unidad de

Propagación Vegetal del Instituto de Biotecnología Esquel (INBIES) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Árboles adultos enfermos naturalmente

La selección de árboles adultos se llevó a cabo en un bosque ubicado en el “Valle 16 de Octubre”, en la provincia de Chubut, Argentina; donde la enfermedad está ampliamente distribuida (Fig. 4). Este valle incluye áreas protegidas (Parque Nacional Los Alerces), como así también chacras y tierras con actividad de manejo forestal y ganadería. No existen datos fiables sobre cuándo y dónde comenzó la enfermedad. Sin embargo, las comunicaciones personales con los habitantes locales sugieren que podría haber comenzado en la década de 1960 (La Manna et al. 2013).

Este bosque en estudio está ubicado aproximadamente en los 43° 10' S y 71° 42' O, a unos 50 km del límite austral de distribución del ciprés de la cordillera en Argentina. Como es habitual, la enfermedad se manifiesta como manchones de mortandad, incluyendo en ocasiones algún ciprés asintomático (Fig. 5).

Se seleccionaron seis (6) árboles que presentaban algún tipo de sintomatología de la enfermedad como por ejemplo, cambio de coloración del follaje, gotas y escurrimientos de resinas sobre la corteza, ramas secas, entre otras. También se seleccionaron individuos sin sintomatología externa de la enfermedad pero que se encontraban infectados. Para ello se observó por debajo de la corteza la presencia de lesiones necróticas en el floema.

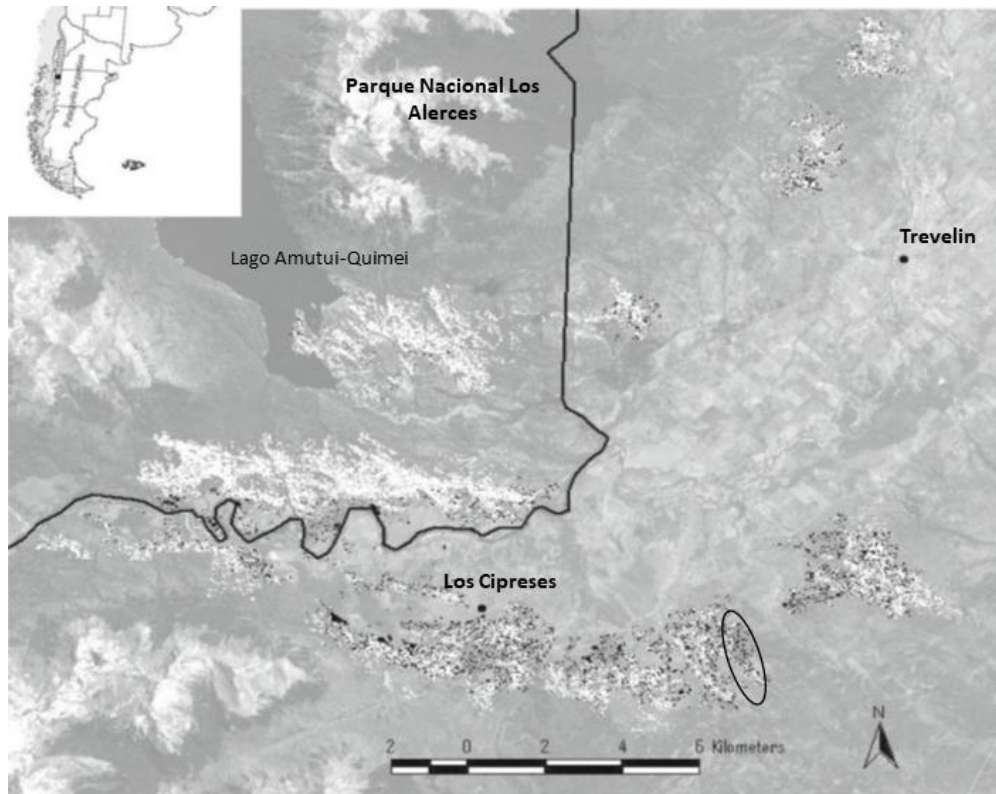


Figura 4. Distribución de los bosques de *Austrocedrus chilensis* sintomáticos (en negro) y asintomáticos (en blanco) en el valle 16 de Octubre. La línea de color negro indica el límite del Parque Nacional Los Alerces, óvalo negro el bosque en estudio (Extractado de La Manna et al. 2013).



Figura 5. Vista general del bosque en estudio. Se puede observar la presencia de árboles enfermos con diferentes grados de severidad de la enfermedad: cambio de coloración de follaje, completamente defoliados y árboles muertos en pie.

De cada árbol, y desde la base del tronco, se tomaron muestras en forma de cuña directamente asociadas a las lesiones necróticas del floema, a tres diferentes alturas del fuste que correspondieron a la zona de avance, parte media y zona más antigua de la lesión (Fig. 6a). Estas tareas de campo se desarrollaron durante los meses de septiembre 2012 y noviembre 2013.

Para evitar confusiones posteriores debido a los cambios de coloración producidos por la oxidación de los tejidos, en el campo y de manera inmediata a la extracción, se delimitaron las zonas lesionadas y sanas en las cuñas obtenidas. Sobre este material se obtuvieron las muestras para los estudios anatómicos (Fig. 6b).

Como control sano, se tomaron muestras de los tejidos de conducción de árboles en un bosque sano de ciprés ubicado en el límite sur de la distribución de la especie (a 17,5 km hacia el sur de la localidad de Corcovado). Se extrajeron cuñas de similares características a las obtenidas para árboles enfermos, obteniendo una cuña por árbol.

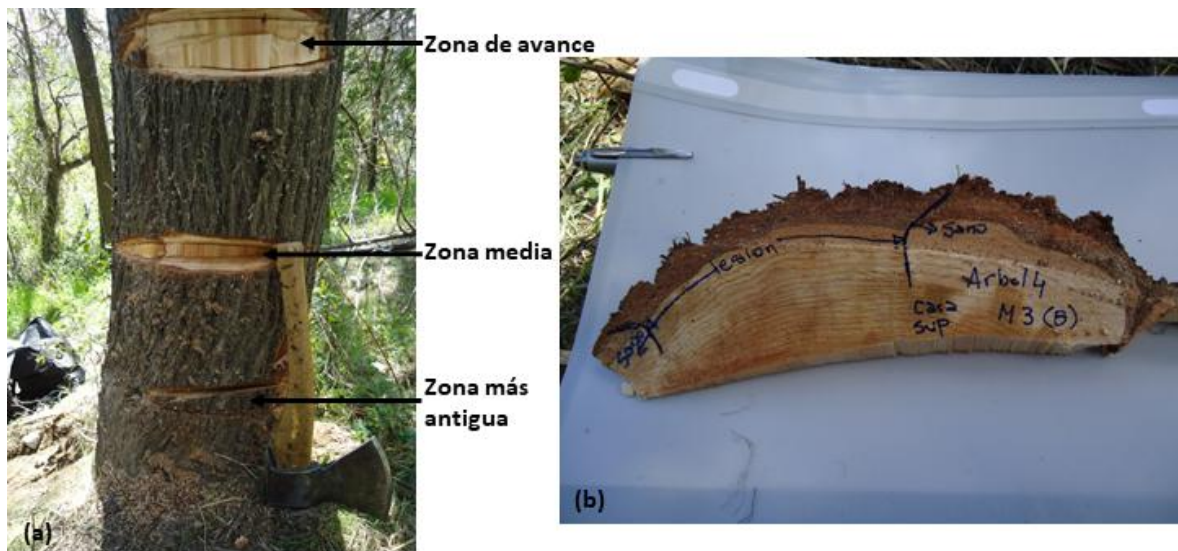


Figura 6. Extracción de cuñas de maderas (floema y xilema) asociado a lesiones necróticas del floema en árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro, infectados naturalmente con *Phytophthora austrocedri*. **(a)** Secuencia de muestras desde la zona más antigua de la lesión en el fuste (bajo), parte media y avance (límite de la lesión). **(b)** Muestra obtenida a campo indicando las zonas sanas y de lesión, sobre este material se obtuvieron las muestras para los cortes anatómicos.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN LABORATORIO

Para árboles jóvenes inoculados artificialmente

Luego de 60 días de la inoculación de las plantas jóvenes, y sobre la porción de tallo que contenía la lesión y hacia el ápice del mismo se realizaron los cortes anatómicos para microscopía óptica (campo claro y de fluorescencia) y para los análisis histoquímicos. La otra porción de tallo (desde la inoculación hacia abajo) se reservó para realizar los ensayos en microscopía electrónica de barrido (MEB). Los cortes microscópicos de 10 μm de grosor en secciones transversales y radiales se obtuvieron de la zona de avance, media e inicio (inóculo) de la lesión (Fig. 7). Se elaboraron y analizaron 300 preparados en microscopio óptico y análisis histoquímico.

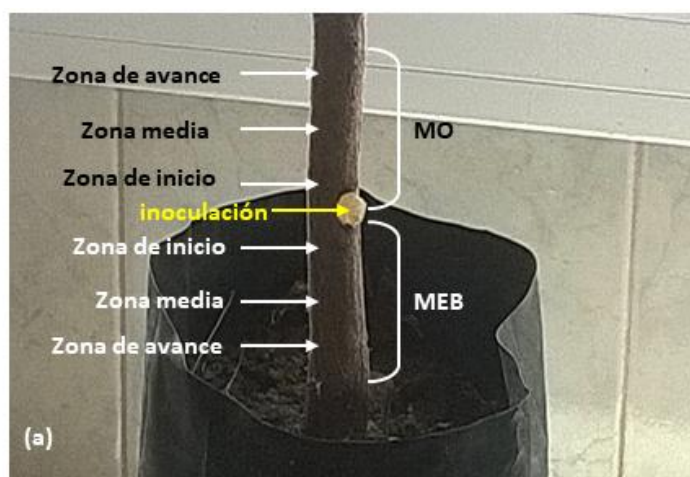


Figura 7. Procedimiento selección de muestras para microscopía óptica y MEB de árboles jóvenes inoculados artificialmente. **(a)** Planta joven de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculadas con *Phytophthora austrocedri*. MO= área de muestra para microscopía óptica, epifluorescencia y análisis histoquímico. MEB= área de muestra para microscopía electrónica.

Para árboles adultos infectados naturalmente

A partir de las cuñas extraídas a campo de los árboles adultos, se seleccionaron en laboratorio las muestras para la obtención de cortes microscópicos. Sobre la parte central de la lesión, se marcaron dos cubos de aproximadamente de 1 cm de ancho por 2 cm de largo dentro de la zona de la lesión abarcando ambos tejidos de conducción (xilema y floema) (Fig. 8). Uno de los cubos de madera se

utilizó para los preparados de microscopía óptica y el otro para la microscopía electrónica de barrido (MEB).

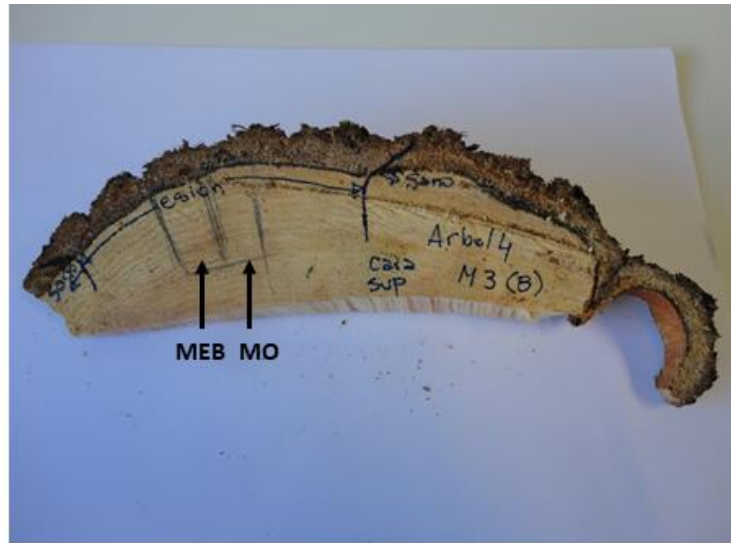


Figura 8. Cuña de floema y xilema extraída de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, indicando sobre la parte central de la zona lesionada las áreas seleccionadas para los estudios anatómicos. Se marcaron 2 cubos de aproximadamente 1cm de ancho por 2 cm de largo abarcando ambos tejidos de conducción (floema y xilema). MEB=área de muestra para microscopía electrónica de barrido; MO=área de muestra para microscopía óptica.

Para cada una de las técnicas de microscopía óptica desarrolladas se elaboraron varios preparados, que fueron posteriormente seleccionados, quedando diez (10) preparados microscópicos de cada sección del leño y de cada muestra, sumando un total de 540. Las observaciones fueron realizadas en microscopio óptico Leica DM500. Las microfotografías se obtuvieron mediante cámara digital Canon EOS Rebel T3i.

Técnicas para la Microscopía Óptica

Los cortes microscópicos (10 μm de grosor) en todas las secciones (radial, tangencial y transversal) se efectuaron mediante xilótomo Leica Hn 40, con cuchillas descartables Patho curtter II (35°, 80 mm). Para el montaje de los preparados se utilizaron 3 técnicas distintas de histología vegetal:

1) Coloración combinada sucesiva doble: safranina-*fast-green*, aplicando técnicas convencionales (D'Ambrogio, 1986) con las siguientes modificaciones en los

tiempos de deshidratación y de tinciones: las muestras se decoloraron en hipoclorito de sodio durante 3 min y luego fueron lavadas tres veces con agua destilada. Luego se inició el proceso de deshidratación en alcohol etílico 60 % durante 5 min, posteriormente se tiñeron en solución saturada de safranina en alcohol etílico 80 %. Paso siguiente se continuó con una deshidratación en alcohol 96 % durante 5 min y se tiñeron en *fast-green* durante 10 s; inmediatamente se pasaron a alcohol etílico absoluto (100 %) y se dejaron durante 10 s para finalmente terminar la deshidratación con xileno. Los cortes fueron montados con acrílico incoloro y secados durante 24 h a temperatura ambiente.

2) Coloración en azul de algodón. La técnica se puede resumir de la siguiente manera: a) decoloración con peróxido de hidrógeno solución al 30% durante 1,30 h, b) enjuague con agua destilada 3 a 4 veces, c) coloración con azul de algodón 24 h, d) enjuague con agua destilada 3 a 4 veces, e) montaje en lactoglicerol.

3) Sin coloración, montaje en agua.

Técnicas para los Análisis Histoquímicos

Los análisis histoquímicos realizados fueron los siguientes:

Detección de almidón

Se empleó lugol para contrastar lignina (amarillo) de carbohidratos no estructurales (negro azulado) (Rivera et al. 1999).

Detección de fenoles

Se empleó Azul de toluidina para contrastar lignina y polifenoles (verde turquesa), carbohidratos (color lila) y aceites (sin color), (Rivera et al. 1999).

Detección de taninos

Para la detección y localización de taninos condensados se empleó la técnica de vainillina-HCl (solución saturada de vainillina en etanol al 95 %), se cubrieron secciones frescas durante 5 minutos y se montaron con una gota de HCl 9 N (naranja rojizo) (Rivera et al. 1999).

Detección de lignina

Se realizó según metodología descrita por Mauch-Mani y Slusarenko (1996). Los cortes de tallos fueron colocados en una solución de floroglucinol 1 % en etanol 70 % durante toda la noche en oscuridad. Luego fueron colocados en portaobjetos y se agregó una gota de HCl concentrado y se incubó por 5 min. Se quitó el exceso de ácido y se montó en agua. Los cortes se inspeccionaron dentro de los 20 min en microscopio óptico. La presencia de lignina se visualiza como una tinción de color rojiza/púrpura.

Técnica para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

De los cubos de madera de árboles adultos destinados para MEB y de las plantas jóvenes (inoculadas y sanas), se realizaron cortes microscópicos (10 μm) en las secciones longitudinal radial y transversal, mediante xilótomo. Luego fueron colocados entre portaobjetos para su secado, sin ejercer presión adicional al peso del vidrio superior.

Por otra parte, se obtuvieron preparados utilizando el método de splitting (fractura): corte por separación mecánica manual sobre sección longitudinal radial. Para este último método, previamente el cubo de madera fue secado a 70 °C en estufa durante una semana. Las muestras obtenidas por splitting se limpiaron para eliminar impurezas y el tejido desgarrado con ayuda de lupa binocular, pinzas y aire comprimido (Fig. 9a). Posteriormente, fueron montadas en los stubs mediante una cinta conductora de doble faz para su posterior metalización en oro. Esto se realizó en equipo marca Denton Vacuum Mod. Desk IV y bajo las siguientes condiciones: 34 mA, 39 mTorr, 90% potencia y 60 seg. Una vez metalizadas las muestras, se colocaron en el porta stub y se introdujeron en la cámara del microscopio (Fig. 9b).

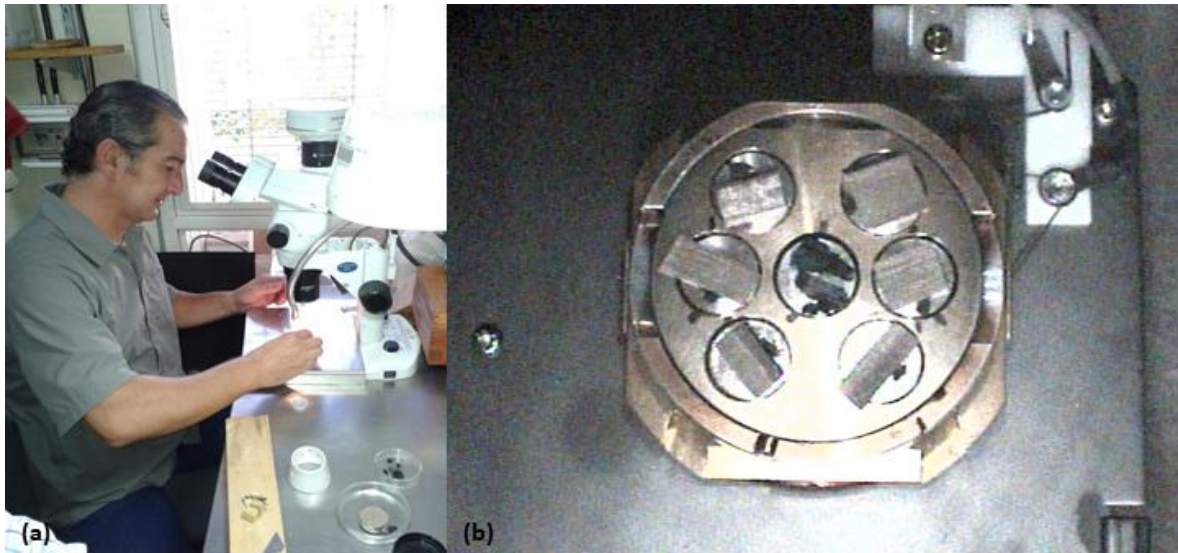
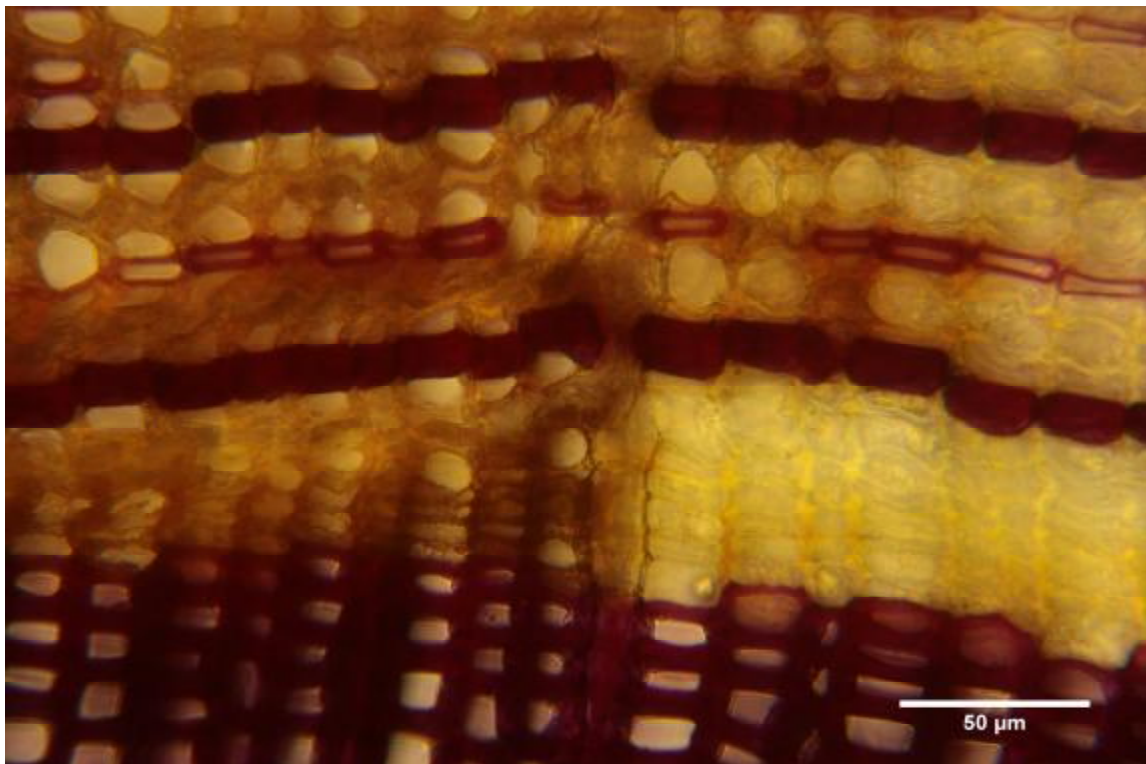


Figura 9. Acondicionamiento de muestras para MEB, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (MEByM) CONICET-Mendoza. **(a)** Selección y limpieza de las muestras obtenidas por splitting. **(b)** Muestras de cortes anatómicos y obtenidos por splitting en la cámara del microscopio electrónico (imagen de luz).

Se trabajó con microscopio marca LEOL, modelo: JSM 6610 LV, modo de observación alto vacío, con detector de electrones secundarios. Los parámetros de trabajo del equipo fueron: tensión (entre 5 a 25 kV), distancia de trabajo (WD=entre 10 a 19mm), basados en el tipo de muestra a observar (biológica). El procesamiento y obtención de las micrografías fueron realizados en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (MEByM) del Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales (IANIGLA) CONICET-Mendoza.

CAPITULO V
RESULTADOS

**ALTERACIONES DEL CAMBIUM VASCULAR Y DEL
FLOEMA DE *Austrocedrus chilensis* AFECTADO POR
*Phytophthora austrocedri***



NECROSIS DEL CAMBIUM Y DEL FLOEMA

Cambium y floema sano

Las características del cambium y del floema observadas en ejemplares sanos, tanto adultos como jóvenes, coincidieron en lo general con las descritas por otros autores para el ciprés de la cordillera (De Magistris, et al. 2001; Castro, M.A; 2009). Por lo tanto en los resultados se detallan solamente aquellos aspectos relevantes para su comparación con los tejidos afectados.

El floema sano de ciprés de la cordillera, tanto en árboles adultos como en árboles jóvenes, evidenció la presencia de células cribosas, parénquima axial y radial, y fibras dispuestas en filas tangenciales regulares. Cada fila de células del parénquima axial siempre tuvo una fila de células cribosas en cada lado. Este ordenamiento compuesto por célula cribosa - célula parenquimática - célula cribosa, estuvo separado por una hilera de fibras (Fig. 10c). Este patrón regular (fibra - célula cribosa - célula parenquimática - célula cribosa - fibra) se mantuvo en el floema activo pero se perdió gradualmente hacia el floema inactivo. Este último se caracterizó por un aumento del tamaño de las células del parénquima radial y axial y por la presencia de canales resiníferos (Fig. 10b,d). Los radios parenquimáticos eran rectos en el floema activo, y sinuosos y expandidos tangencialmente hacia floema inactivo. Las filas de fibras se volvían desorganizadas y discontinuas. Presentaba conductos de resina axial aislados, con células epiteliales y una vaina de parénquima exterior (llamadas también células subsidiarias). En la zona exterior al floema inactivo (peridermis), los conductos de resinas eran más elípticos. En el floema activo las células cribosas eran cuadradas a rectangulares en sección transversal, con vértices ligeramente redondeados, comprimidas radialmente por las células del parénquima axial. Las células del parénquima axial eran de forma de circular a rectangular y alargadas en sección transversal (Fig. 10c).

Las fibras en sección transversal eran cuadradas a rectangulares, radialmente aplanadas y dispuestas en filas tangenciales continuas. Se observaron dos tipos de fibras: a) fibras de paredes gruesas lignificadas, con lumen pequeño, y b) fibras inmaduras de paredes delgadas no lignificadas. Estas últimas principalmente en la zona de floema activo. (Fig. 10a,c). El cambium vascular compuesto por una delgada capa tangencial de 3 a 6 células de ancho en sección transversal, presentaba células de forma rectangular, con paredes delgadas.

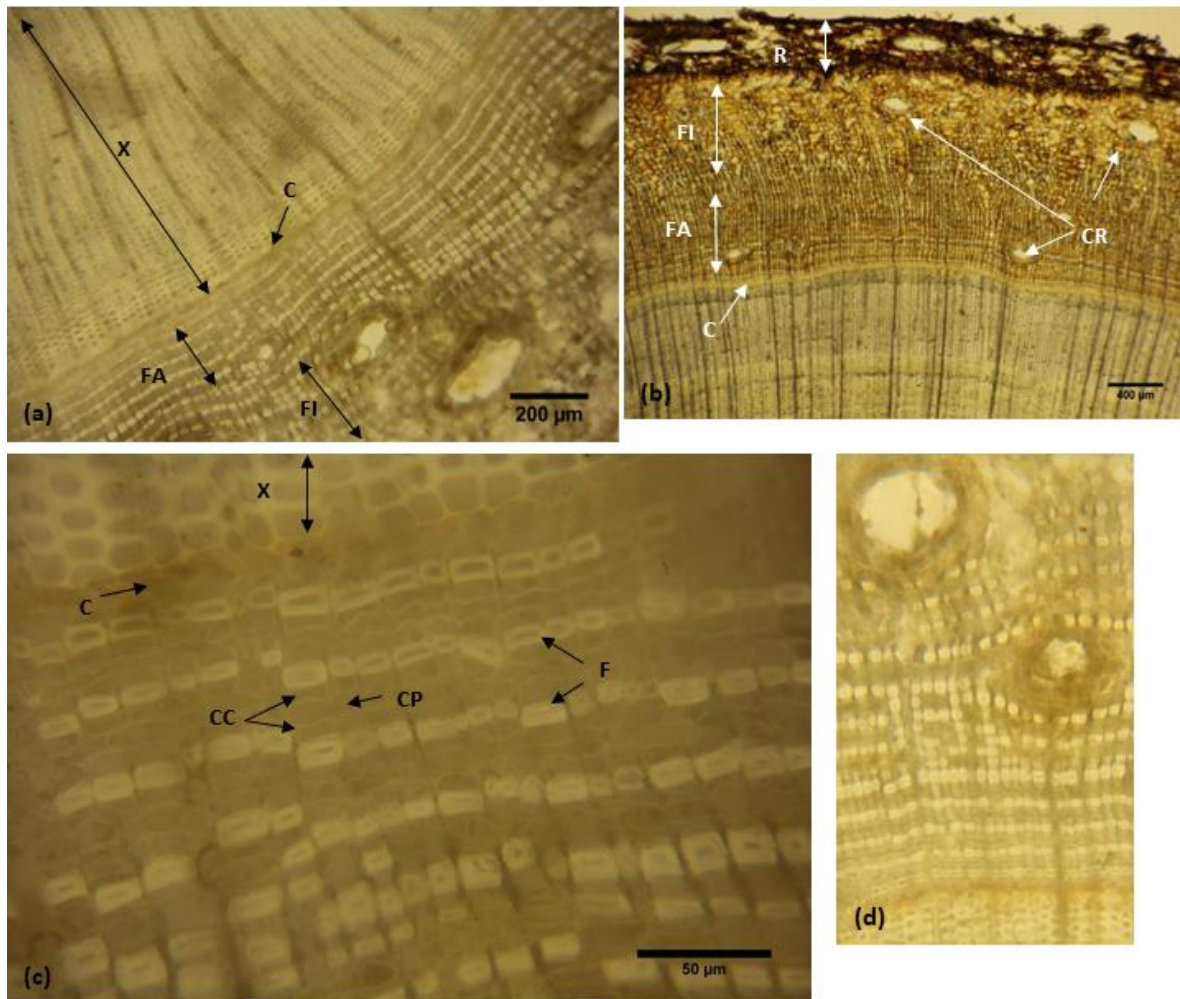


Figura 10. Sección transversal del tallo de planta sana de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad , sin tinción (montaje en agua). **(a)** Estructura y disposición de los tejidos de conducción sanos de ciprés de la cordillera. **(b)** Vista general donde se observa el cambium vascular en color amarillento hialino, sin necrosis, colapsos ni deformaciones y con un ancho uniformemente distribuido en toda su extensión. Los canales resiníferos normales en el floema son circulares y luego se vuelven de forma elíptica en el ritidoma (R). **(c)** Detalle de floema activo sano: ordenamiento compuesto por célula cribosa (CC)-célula parenquimática (CP)-célula cribosa (CC); separado por una hilera de fibras (F). Las células cribosas son de forma redondeadas a rectangulares al igual que las parenquimáticas, turgentes y con contenidos citoplasmático. Filas tangenciales continuas de fibras, con paredes hialinas y lúmenes reducidos. **(d)** Canales resiníferos normales dispuestos en forma aislada en el floema inactivo. X=xilema; C=cambium; FA=floema activo; FI=floema inactivo; CC=células cribosas; CP=células del parénquima axial; F=fibras.

Cambium y floema afectado

En los ensayos con plantas jóvenes, luego de 60 días de haber sido inoculadas artificialmente, en la zona de avance de la lesión se evidenció al microscopio óptico una necrosis generalizada en el cambium vascular. (Fig. 11a,d).

Esta necrosis estaba caracterizada por una coloración marrón y disminución del grosor de dicho tejido debido al colapso de las células, y por una malformación celular tanto hacia la zona del floema como del xilema. (Fig. 11a y 11b). Comparando con el tallo sano, éste presenta la zona del cambium vascular en color amarillento, sin colapso celular, sin necrosis ni angostamiento de los tejidos de conducción (Fig 11c).

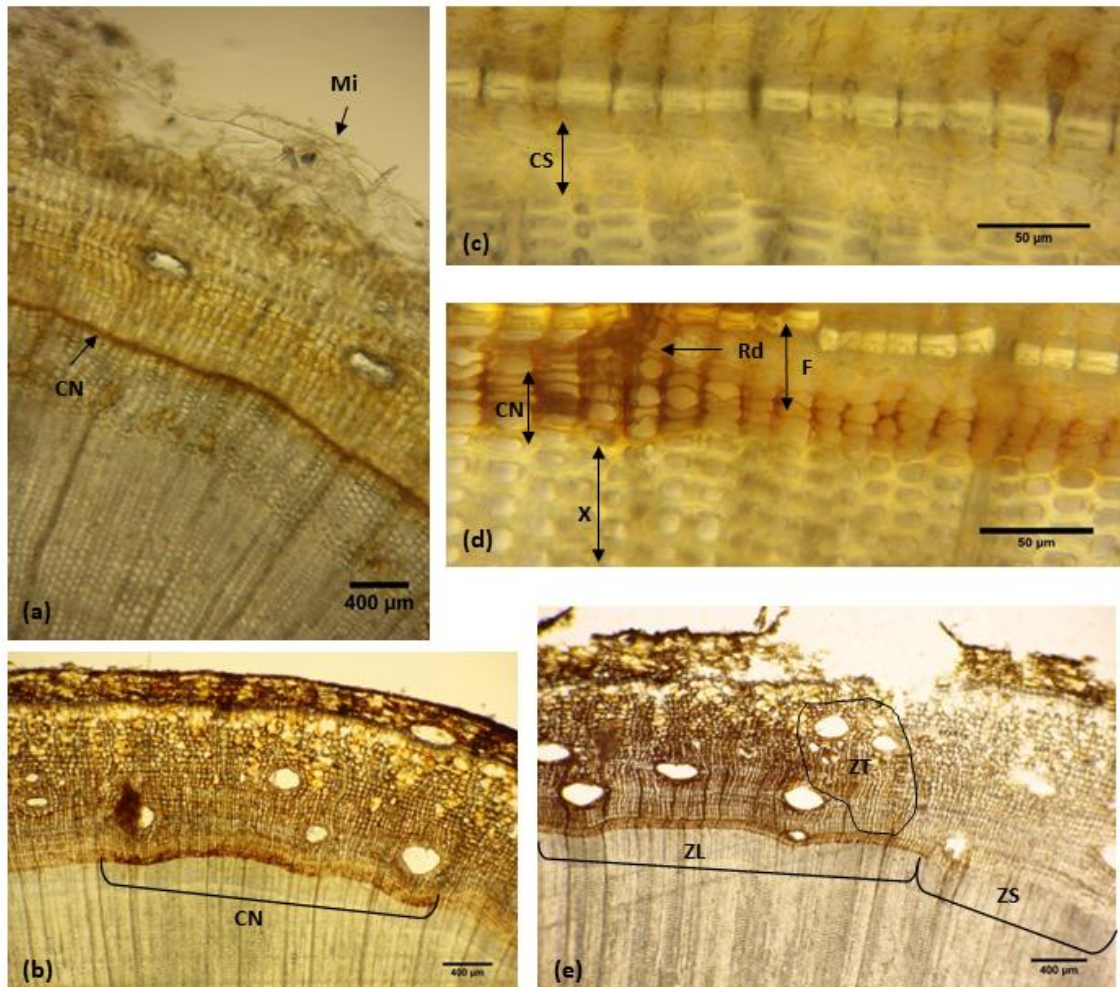


Figura 11. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad , inoculada con *Phytophthora austrocedri* montaje en agua: **(a)** Necrosis generalizada del cambium vascular, caracterizada por su color marrón, se observa micelio sobre la zona de inoculación. **(b)** Vista general del avance de la lesión, obsérvese la necrosis que se inicia en el cambium vascular y que luego se extiende hacia las primeras células del floema . **(c)** Detalle del cambium sano, con células de paredes amarillo hialina, rectangulares y turgentes. **(d)** Detalle del cambium afectado mostrando las paredes celulares necrosadas de color marrón y deformadas . También se observa el inicio de la necrosis sobre el tejido floemático, con un frente uniforme delimitado por los radios parenquimáticos (Rd). **(e)** En la zona de avance de lesión, se muestra la zona de transición (ZT) entre la zona lesionada (ZL) completamente de color marrón por la necrosis y la zona sana (ZS) sin coloración. Mi=micelio; CN=cambium necrosado; CS=cambium sano; F=floema ; X=xilema; Rd=radios parenquimáticos; ZL=zona lesionada; ZT=zona de transición; ZS=zona sana

El floema afectado por *P. austrocedri* en la zona de avance de la lesión presentaba un tinte completamente marrón, en contraste con la zona sana cuya tonalidad era amarillento-ocre (Fig. 11e, 12a). Las primeras células perjudicadas fueron las del parénquima axial que habían perdido sus contenidos y se veían completamente necrosadas, colapsadas, con las paredes deformadas y de color marrón (Fig. 11b). En conjunto, las células del parénquima axial colapsadas formaban una “banda engrosada de necrosis continua” dispuesta tangencialmente entre las células cribosas (Fig. 12d). También se veía afectado el parénquima radial, donde las células constitutivas de los radios parenquimáticos se presentaban deformadas, colapsadas y con el color castaño oscuro característico de las células necrosadas. (Fig. 12d).

Las células cribosas se presentaron sin contenidos celulares y con un cambio de su forma que, de ser cuadrada a rectangular en sección transversal en el floema no afectado, pasó a ser más redondeada u oval en el afectado, ya que dejaron de estar comprimidas radialmente por las células del parénquima axial debido a la necrosis de éstas últimas. Los radios parenquimáticos en la zona lesionada del floema activo se presentaban deformados y sinuosos, con células de tamaño heterogéneo y mayor que el de las células sanas. Estos radios estaban necrosados y llegaban incluso a colapsar. Las fibras presentaban cambios en su coloración, tornándose más oscuras, con ciertos tintes de coloración marrón en sus paredes (Fig. 12d).

Estas alteraciones daban origen a una disminución del espesor del tejido floemático y a una compresión y deformación de todos sus elementos. El patrón regular (fibra-célula cribosa-célula parenquimática-célula cribosa-fibra) que presentaba el floema sano, pasó a observarse de la siguiente manera: fibra-célula cribosa “vacía”- “banda engrosada de necrosis continua” (por muerte y colapso de las células parenquimáticas)-célula cribosa “vacía” -fibra) (Fig. 12d). Además, las células del cambium también colapsaron y esto se observó como un angostamiento del cambium vascular en la zona de la lesión. (Fig. 12b). Estas anomalías del tejido floemático también fueron observadas en la zona media de la lesión y del inóculo, con un mayor desarrollo tangencial y radial produciendo la muerte tisular de la zona afectada (Fig.12e,f).

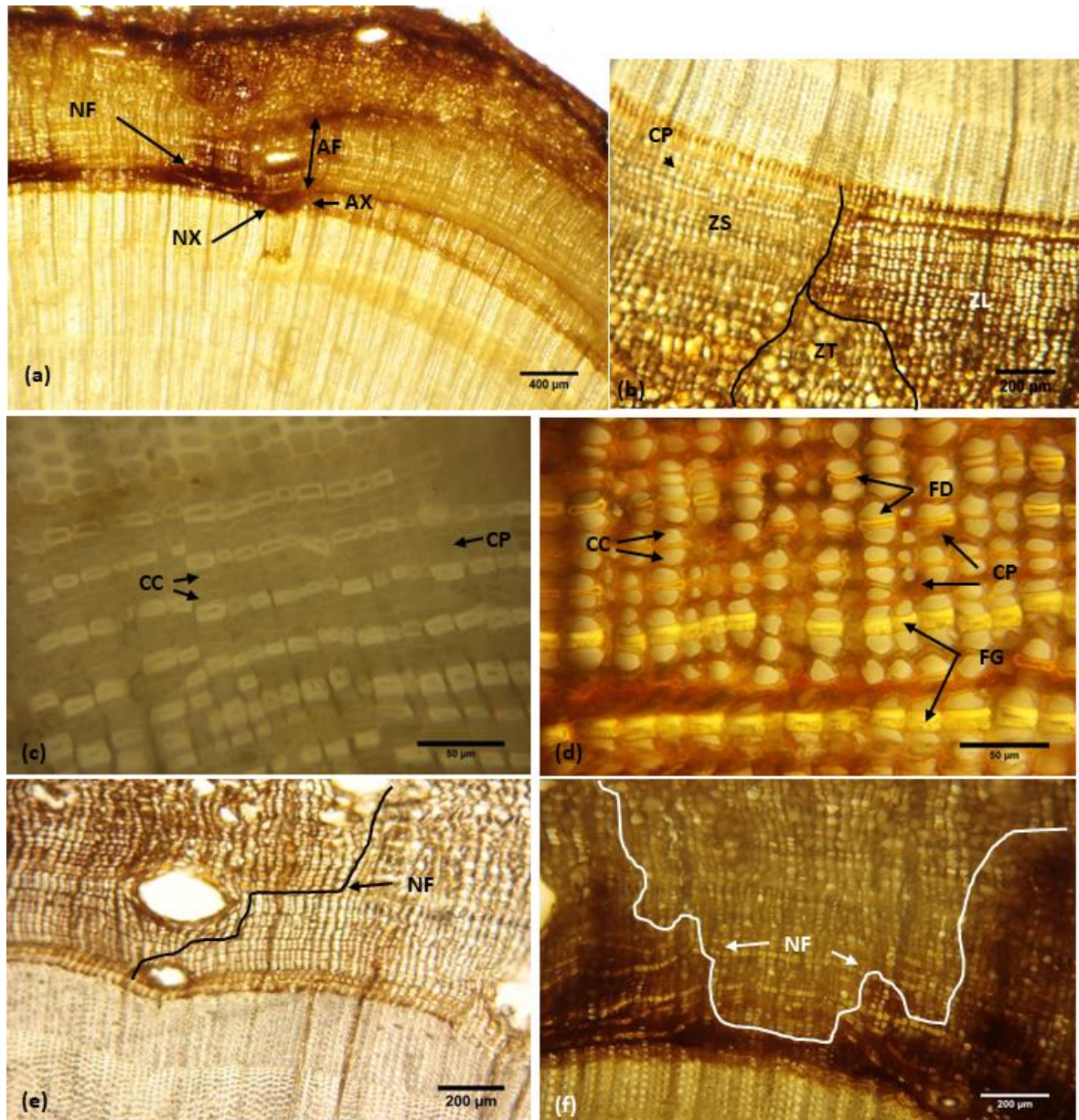


Figura 12. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad , inoculada con *Phytophthora austrocedri* , sin tinción (montaje en agua). **(a)** Uno de los extremos del avance de la lesión, donde se puede observar la necrosis general del cambium vascular y el angostamiento que se produce, tanto del tejido floemático (AF) como xilemático (AX), en ese mismo extremo y acompañados de una necrosis y desorganización generalizada de las células de floema (NF) y parcialmente del xilema (NX). **(b)** Límite entre zona sana (ZS) y afectada (ZL) del cambium y del floema. Entre ambas zonas se encuentra la zona de transición (ZT). Obsérvese la coloración marrón oscura de la zona afectada; en cambio en la zona sana del floema se observa un color amarillo ocre principalmente de las células del parénquima axial que se encuentran turgentes y con contenidos citoplasmáticos. **(c)** Vista general del floema sano. Células cribosas (CC) y parenquimáticas (CP) turgentes y con contenidos celulares. **(d)** Detalle del floema en la zona de avance de la lesión. Células parenquimáticas (CP) necrosadas, colapsadas y con coloración marrón. Las células cribosas, vacías sin contenidos celulares (“huecas”). Se puede apreciar un cambio en la coloración de las paredes de las fibras floemáticas. **(e)** y **(f)** Zona media de la lesión donde la lesión de cambium comienza a extenderse y avanza tangencialmente hacia el floema. FD=fibras paredes delgadas; FG=fibras paredes gruesas.

La tinción con azul de algodón permite visualizar muy bien el cambium necrosado y la diferencia entre las células sanas del parénquima axial de las necrosadas y colapsadas. En el primer caso, se observa una tinción en color azul de todo el contenido celular (tanto de las células parenquimáticas como de las células cribosas), mientras que en la zona afectada se reduce a una pequeña línea azul que forman las células parenquimáticas colapsadas y sin tinción por falta de contenidos para el caso de las células cribosas (Fig. 13a).

En mayor aumento (Fig 13b) se puede ver el detalle de lo que ocurre con las células parenquimáticas (colapso, paredes deformadas de color marrón). Además se observan las células cribosas vacías (“vacías”), sin contenido celular.

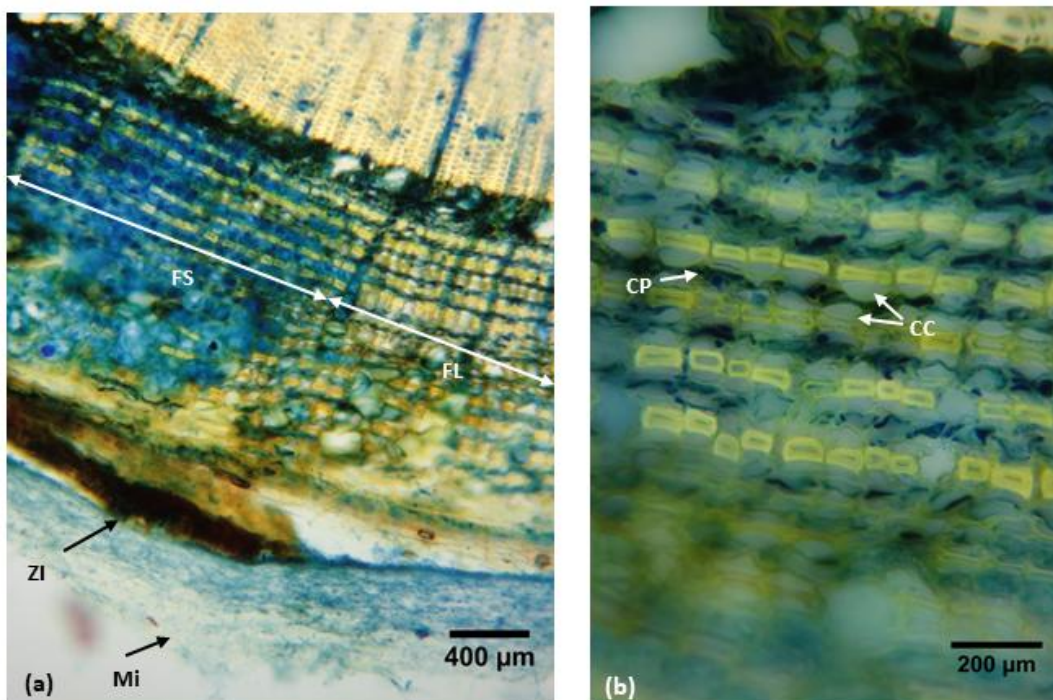


Figura 13. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad, inoculada con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de algodón y montaje con lactoglicerol. (a) Se observa la diferencia entre las células sanas del parénquima axial y cribosas (teñidas de azul) en la zona sana (ZS) de las necrosadas y colapsadas en la zona lesionadas (ZL) que se reduce a una pequeña línea azul. (b) Detalle de las células parenquimáticas axiales del floema, totalmente colapsadas, y casi sin contenidos celulares (tinción azul) y las células cribosas se encuentran sin contenidos. FS=floema sano; FL=floema lesionado; ZI=zona de inoculación; Mi=micelio; CP=células del parénquima axial; CC=células cribosas.

En los árboles adultos infectados naturalmente por *P. austrocedri* también se observó que en la zona de avance de la lesión, la necrosis de las células que conforman el cambium vascular, luego se extendió hacia el floema (Fig. 14b). Las observaciones de las zonas medias y antiguas de la lesión se correspondieron en

su mayoría con las malformaciones celulares vistas y descritas para árboles jóvenes (Fig. 14a-f).

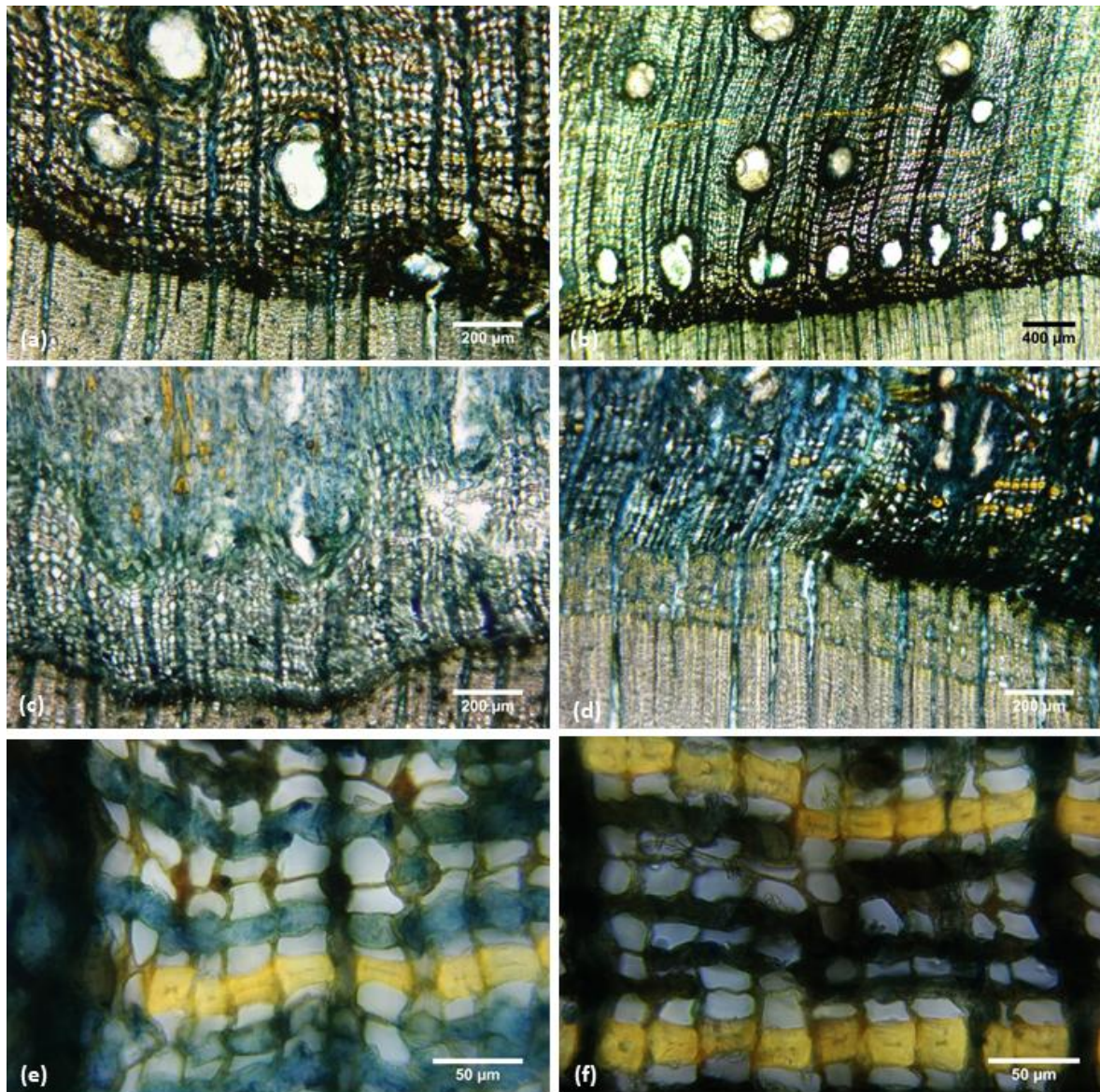


Figura 14. Sección transversal del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de algodón. Necrosis del cambium y del floema. **(a)** Zona de avance de la lesión, se observa una necrosis general de cambium caracterizada por su color oscuro. **(b)** Extensión de la necrosis hacia el floema, afectando principalmente el sistema parenquimático. **(c)** Necrosis del floema y desorganización generalizada de las células del floema que va conformando una zona «tipo barrera». **(d)** Diferencia entre la zona sana del cambium y floema y la zona afectada (color negro). **(e)** y **(f)** Detalle de la zona media de la lesión entre el floema sano (d) y el afectado (e) donde las células del parénquima axial sanas están turgentes y se tiñeron de azul, mientras que en floema afectado la necrosis general se manifestó de color oscuro y con células deformadas y colapsadas.

FORMACIÓN DE CANALES RESINÍFEROS TRAUMÁTICOS Y BOLSONES DE RESINA

Seguidas a las necrosis del cambium y del floema, otra de las alteraciones que se evidenció en los ensayos con plantas jóvenes inoculadas artificialmente, fue la formación de canales resiníferos traumáticos en el floema activo. Éstos se ubicaron sobre toda el área afectada por la lesión mientras que, en la zona sana adyacente no se observaron y continuó el desarrollo normal del floema (Fig. 15a,b). En un solo caso se observó la formación de canales traumáticos fuera del área afectada por la lesión y hacia los costados de la misma. (Fig. 15c).

Por otra parte, en los árboles adultos, es de destacar que el 100 % de las muestras analizadas mostraron la presencia de canales resiníferos traumáticos en el floema, tanto en la zona de avance, media y más antigua de la lesión (Fig. 16a). La característica principal de dichos canales fue su desarrollo tangencial formando una red anastomosada (Figura 16b,c), y que a su vez puede fusionarse para formar bolsas de resina (Fig. 16d). Esta última anomalía no fue observada en las plantas jóvenes inoculadas artificialmente.

Dado la anatomía leñosa del ciprés de la cordillera, que posee canales resiníferos exclusivamente en el floema y carece de los mismos en el xilema, se evidenció que la formación de conductos traumáticos se restringe únicamente a la zona del floema y peridermis.

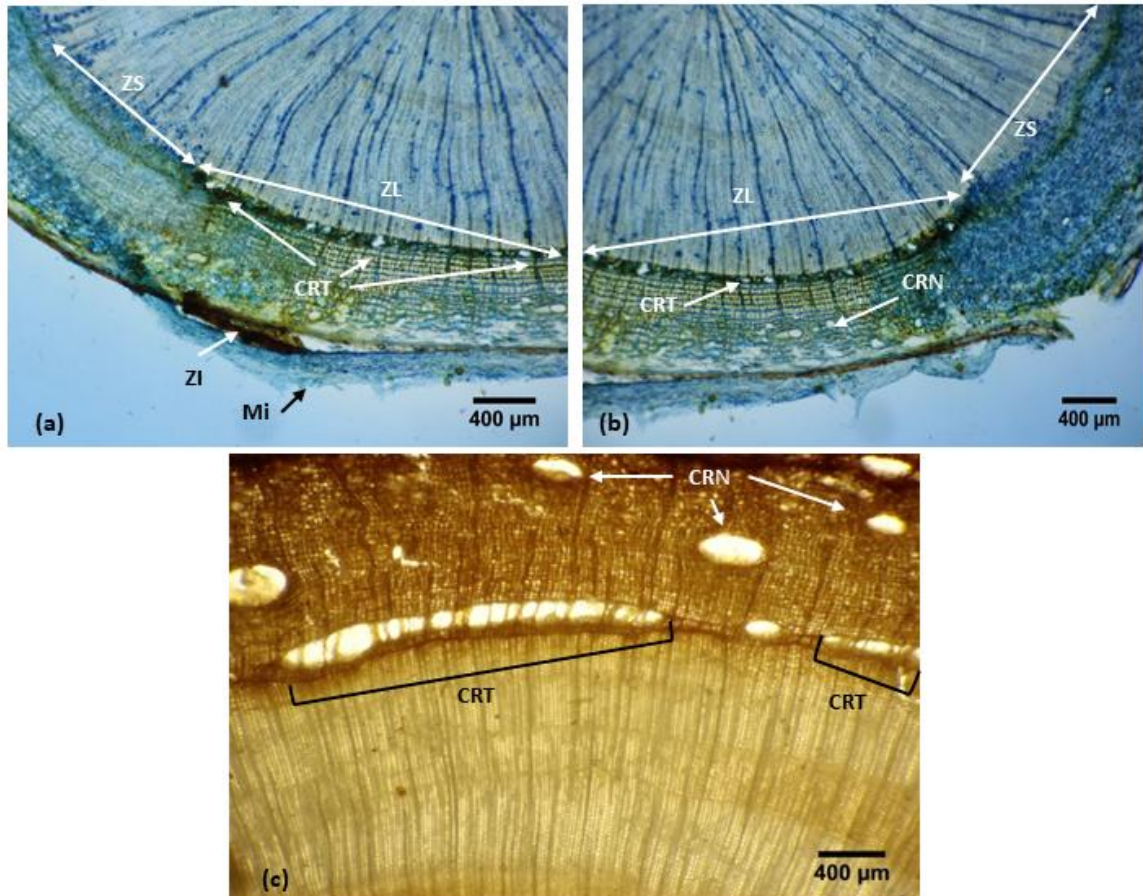


Figura 15. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad , inoculada con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de algodón y montaje con lactoglicerol (a y b), y sin tinción con montaje en agua (c). **(a)** y **(b)** Extremos izquierdo y derecho de la lesión, a los 30 días de inoculados se evidenció la formación de canales resiníferos traumáticos en el floema activo, sobre toda el área afectada por la lesión (ZL). Se observa la inducción a la formación de canales resiníferos traumáticos sobre el cambium vascular y mientras que en el floema inactivo se encuentran los canales resiníferos normales (CRN). **(c)** Lesión de avance en plantas jóvenes. Formación de canales resiníferos traumáticos (CRT) en el lado opuesto de la lesión. Obsérvese la red tangencial anastomosada de CRT formada en el floema activo. Hacia la zona del floema inactivo se observan CRN, dispuestos en forma aislados y solitarios. ZS=zona sana sin canales resiníferos; ZL=zona lesionada; CRT=canales resiníferos traumáticos; CRN=canales resiníferos normales; ZI=zona de inoculación; MI=micelio.

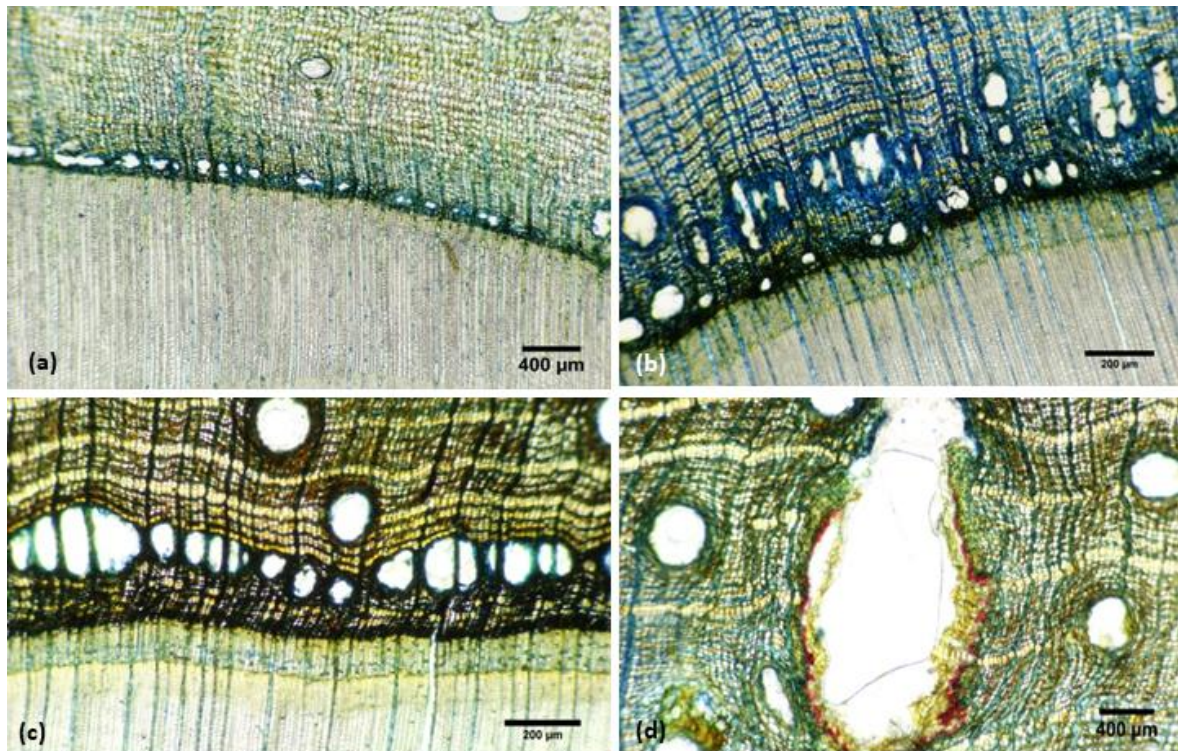


Figura 16. Sección transversal del tronco de árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro a la altura del pecho; afectados naturalmente con *Phytophthora austrocedri*; tinción con azul de algodón y montaje en lactoglicerol. **(a)** Zona de avance de la lesión que muestra el desarrollo tangencial de una fila anastomosada de CRT. **(b)** Zona media de la lesión con formación de canales resiníferos traumáticos (CRT) dispuestos en filas dobles anastomosadas. **(c)** Vista en detalle de CRT adultos en la zona más antigua de la lesión. **(d)** Bolsón de resina traumática en la zona media de la lesión. CRT=canales resiníferos traumáticos.

ANALISIS HISTOQUIMICO

Detección de almidón

En el análisis histoquímico con lugol en individuos sanos, el cambium denotó una coloración amarillo-dorado homogénea, sin colapso celular (Fig. 17a,b). En el floema estos estudios indicaron que el almidón se concentra principalmente en las células del parénquima axial de la zona del floema inactivo, en el sistema del parénquima radial, como así también en las células subsidiarias de los canales resiníferos normales (tinción negro-azulado) (Fig. 17b).

En la zona de la lesión necrótica producida por el *P. austrocedri*, el cambium vascular se observó con coloración anaranjada a marrón sin evidencias de depósitos de almidón. En el floema afectado hubo una pérdida de almidón en el parénquima axial y radial (Fig. 17c,d).

Por otra parte, en el avance de la lesión en el floema afectado por *P. austrocedri* se observó una mayor concentración de almidón en la zona de transición (ubicada entre la lesión y zona sana del floema), donde se produce una malformación celular “tipo barrera” (Fig. 18a,b).

En la zona media de la lesión, la presencia de almidón del sistema parenquimático va en disminución hasta hacerse casi nula al igual que en la zona del inóculo (Fig. 18c,d).

En el avance de la lesión, en la formación de los canales resiníferos traumáticos, no se detectó la presencia de almidón en las células iniciales epiteliales ni adyacentes (Fig. 18e,f). Esto indicaría una diferencia en la constitución de compuestos de las células epiteliales y subsidiarias entre los canales resiníferos normales y los traumáticos.

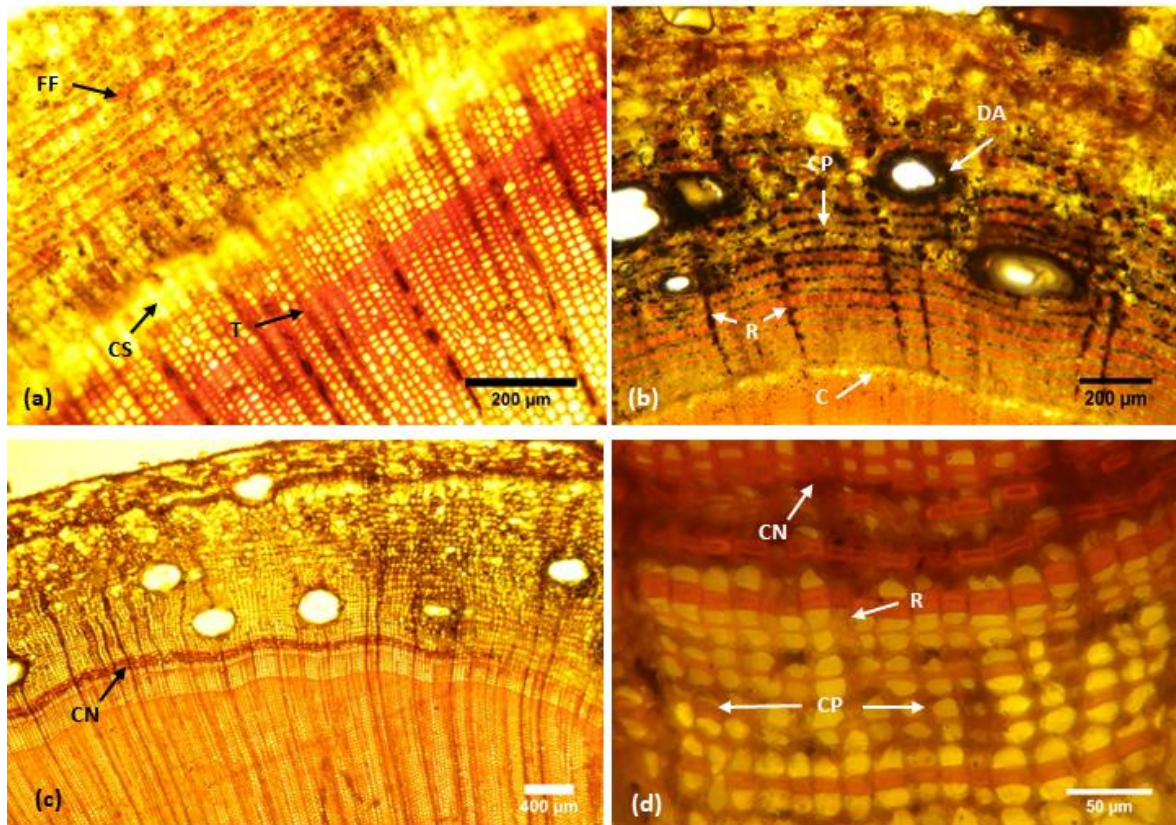


Figura 17. Sección transversal del tallo de planta sana de *Austrocedrus chilensis* de 8 años (a y b) e inoculada con *Phytophthora austrocedri* (c y d), tinción con lugol. **(a)** Se observa el cambium sano (CS) amarillo dorado, las paredes de las fibras y traqueidas en color anaranjado, y los depósitos de almidón en color negro azulado en células del parenquimáticas del floema. **(b)** Vista general de los depósitos de almidón en el floema (color negro-azulado), principalmente en las células parenquimáticas (radiales y axiales) y de los canales resiníferos normales. El cambium vascular sano se observa en color amarillo-dorado. **(c)** Zona de avance de la lesión se observa el cambio de coloración del cambium afectado (anaranjado) y la ausencia de los depósitos de almidón del parénquima en células axiales, radiales y de los canales resiníferos. **(d)** Detalle de la zona de avance de la lesión, donde se observa la pérdida casi total del almidón de las células parenquimáticas axiales (CP) y radiales (R). CS=cambium sano; DA=depósitos de almidón; CN=cambium necrosado; FF=fibras floemáticas; T=traqueidas; CL=cambium lesionado.

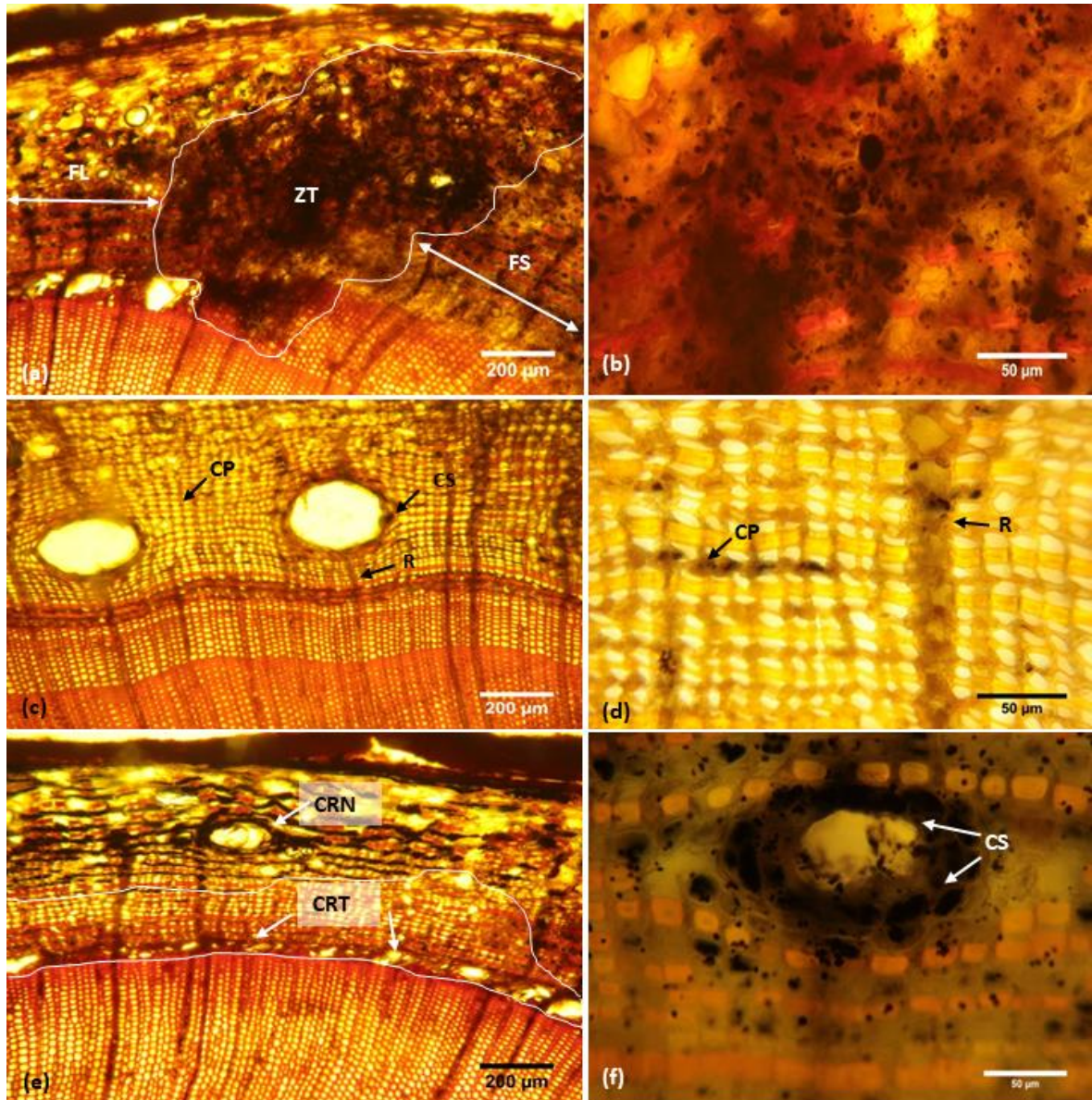


Figura 18. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri*, tinción con lugol. **(a)** Zona de transición entre floema lesionado (izquierda) y sano (derecha) del avance de la lesión, con gran acumulación de almidón en las células deformadas de este tejido. **(b)** Detalle de la acumulación de almidón en células deformadas del parénquima floemático en la zona de transición. **(c)** Pérdida de almidón de los sistemas parenquimáticos y de las células subsidiarias (CS) y epiteliales de los canales resiníferos (sin depósitos negro azulados) en la zona media de la lesión. **(d)** Detalle de los sistemas parenquimáticos casi sin contenidos de almidón, se observan algunos restos de almidón (color negro azulado), en algunas en células necrosadas y colapsadas del parénquima axial (CP) y de los radios (R). **(e)** Zona de lesión con inicio en la formación de canales resiníferos traumáticos (CRT); donde no se observan depósitos de almidón en las células subsidiarias de dichos canales, como así también en la zona del floema activo (FA) afectado (en parénquima axial y radial). **(f)** Detalle de acumulación de almidón (color negro azulado) en células subsidiarias de los canales resiníferos normales (CRN). ZT=zona de transición; FL= floema lesionado; FS=floema sano; CP=parénquima axial; CS=células subsidiarias de canales resiníferos; R=radio parenquimático. CRN=canales resiníferos normales; FA=floema activo; CRT=canales resiníferos traumáticos.

Detección de compuestos fenólicos

En tinción con azul de toluidina (Fig. 19 y 20) el cambium sano se observó en color lila, al igual que los elementos del sistema parenquimático del floema (axilar y radial) y las células epiteliales y subsidiarias de los canales resiníferos, mientras que las fibras y traqueidas se observaron en color celeste y las células cribosas en color blanco a rosado. (Fig. 19 a,b).

En el avance de las lesiones, se observó un cambio muy notable entre la zona sana y la afectada. Esta última presentó un cambio de coloración (de lila a blanco) en las células del parénquima axial, lo que indicaría la pérdida de carbohidratos, y la falta de contenidos de las células cribosas. Los radios parenquimáticos se observaron de color casi negro (Fig. 19c,d).

En mayor aumento se observó el cambio de coloración de azul a turquesa (indicativo de la presencia de compuestos fenólicos), que presentaron las fibras floemáticas de la zona de la lesión y el vaciamiento de contenidos de carbohidratos de las células cribosas y parenquimáticas (cambio de color rosado a blanco). (Fig. 19e).

Por otra parte, el cambium necrosado en tinción con azul de toluidina, se observó en color oscuro casi negro, en vista general de sección transversal (Fig.20). Las células se tiñeron de color negro azulado, mientras que las primeras filas tangenciales de fibras floemáticas adquirieron color turquesa (reacción positiva para compuestos fenólicos) (Fig. 20b). En las zonas medias e iniciales de la lesión se observó esta misma reacción que abarcó la totalidad de los tejidos afectados.

En la Fig. 20c se observa la diferencia en la zona límite entre la lesión y el cambium sano. Se observó el cambio de coloración de las fibras floemáticas (turquesa) y cambiales (negro-azulado) en la prueba de compuestos fenólicos.

La zona límite entre la lesión y la zona sana, donde se produce la deformación celular "tipo barrera", mostró el desordenamiento de las fibras con cambio de coloración de azul a turquesa (Fig. 21b).

En la lesión media se observó con mayor contraste el cambio de coloración del área afectada, donde también fue positiva la presencia de compuestos fenólicos (turquesa) en las células del parénquima axial y en las fibras floemáticas. Se observaron en color negro las células del parénquima (Fig. 21b,c). Similar situación se visualizó en los árboles adultos analizados (Fig. 22a-d)

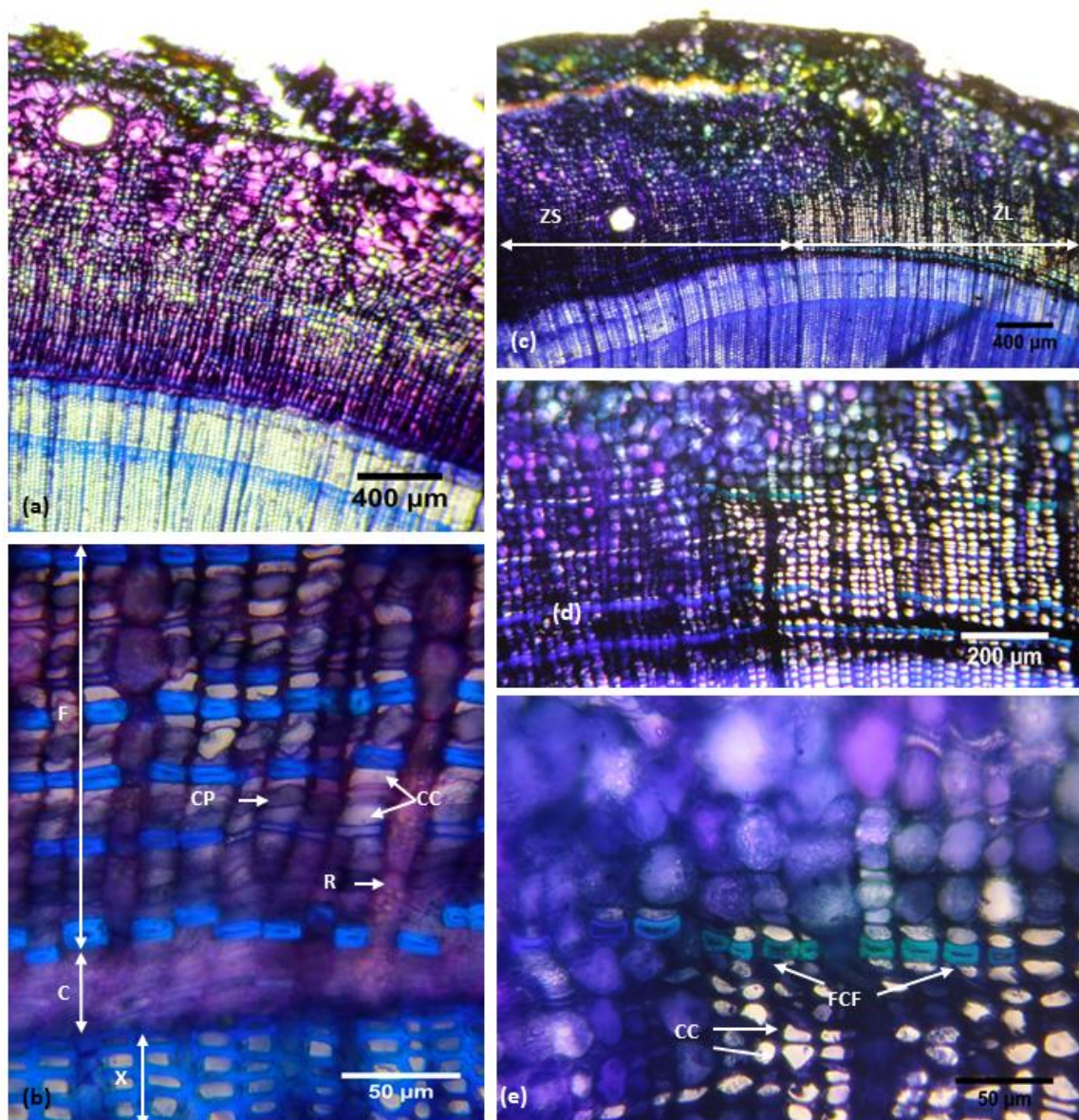


Figura 19. Sección transversal del tallo de planta sana (a, b) de *Austrocedrus chilensis* de 8 años e inoculada con *Phytophthora austrocedri* (c-e) tinción con azul de toluidina. **(a)** Vista general del floema sano en tinción con azul de toluidina: se observan los radios y células del parénquima axial en color lila; fibras y traqueidas en color azul. **(b)** Detalle de floema, cambium y xilema sano de *A. chilensis*. Cambium de color rosado, fibras y traqueidas de color azul. Las células del sistema parénquimático (axial y radial) rosadas indicando la presencia de carbohidratos y; células cribosas rosadas a blancas. Todas las células turgentes sin colapsos ni necrosis. **(c)** y **(d)** Zona de avance de la lesión, donde se observa la diferencia entre la zona sana (ZS) y lesionada (ZL). En esta última zona, las células cribosas y parenquimáticas se observan traslúcidas (blancas) por la pérdida de carbohidratos y falta de sus contenidos; radios en color negro azulado. **(e)** Detalle de la zona de avance de la lesión con deposición de compuestos fenólicos (coloración turquesa) en las fibras floemáticas (FCF). Se observan las células cribosas (CC) traslúcidas (blancas) sin contenidos y pérdida de carbohidratos. F=floema; C=cambium; X=xilema CC=células cribosas; CP=células del parénquima axial; R=radio parenquimático; ZS=zona sana; ZA=zona afectada; FCF=fibras con depósitos de compuestos fenólicos.

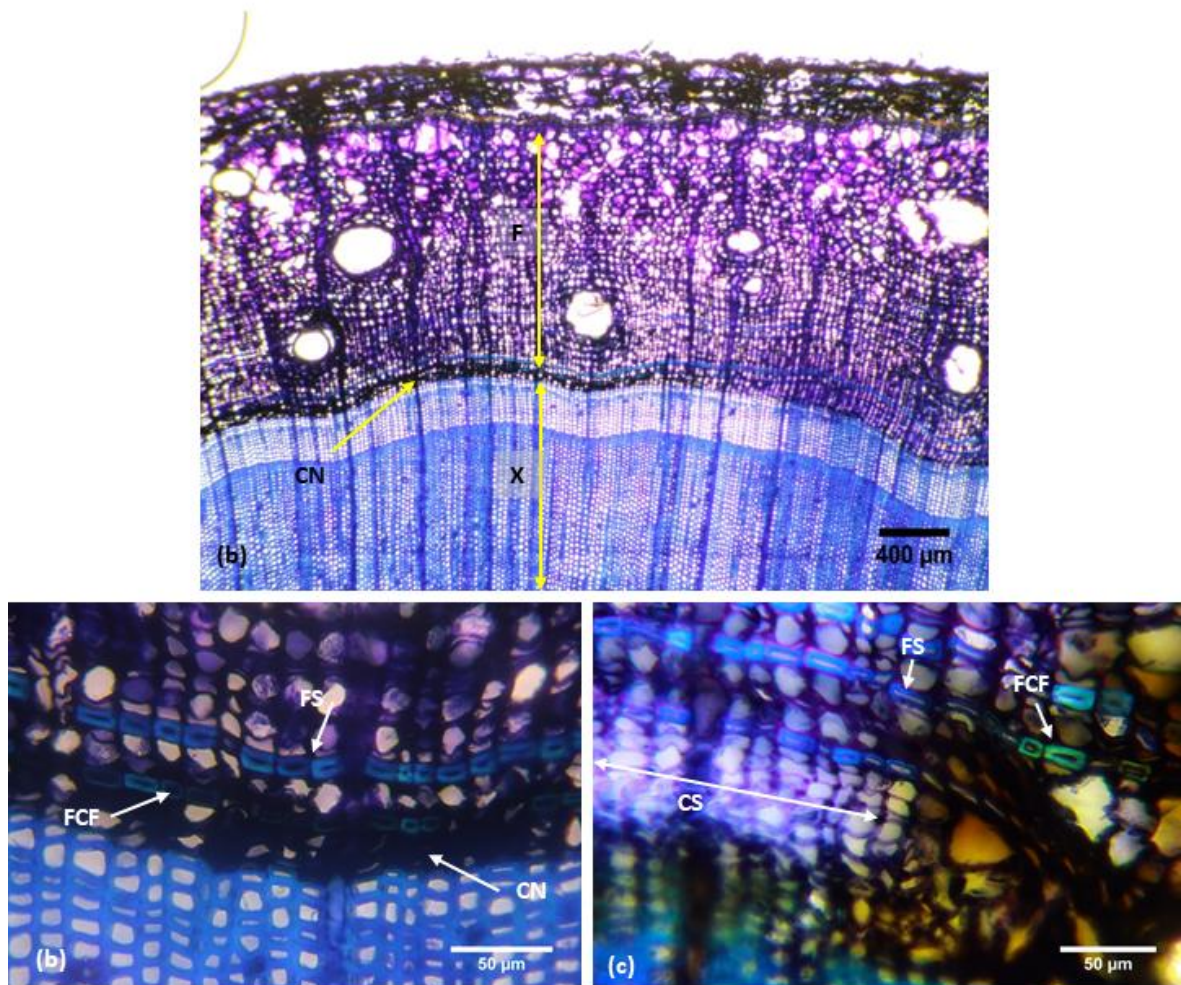


Figura 20. Sección transversal del tallo de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de toluidina. **(a)** Vista general zona de avance de la lesión, se observa el cambium vascular de color negro, entre el xilema de color azul (X) y el floema (F). **(b)** En el avance de la lesión, el cambium necrosado se tiñó de color azul oscuro y la primera fila de fibras del floema en color turquesa (reacción positiva compuestos fenólicos). Las fibras sana en color celeste. **(c)** Zona límite entre la lesión y el cambium sano. Presencia de fibras con acumulación de compuestos fenólicos (color turquesa). F=floema; X=xilema; CN=cambium necrosado; CS=cambium sano; FCF=fibras con acumulación de compuestos fenólicos. FS=fibras sanas.

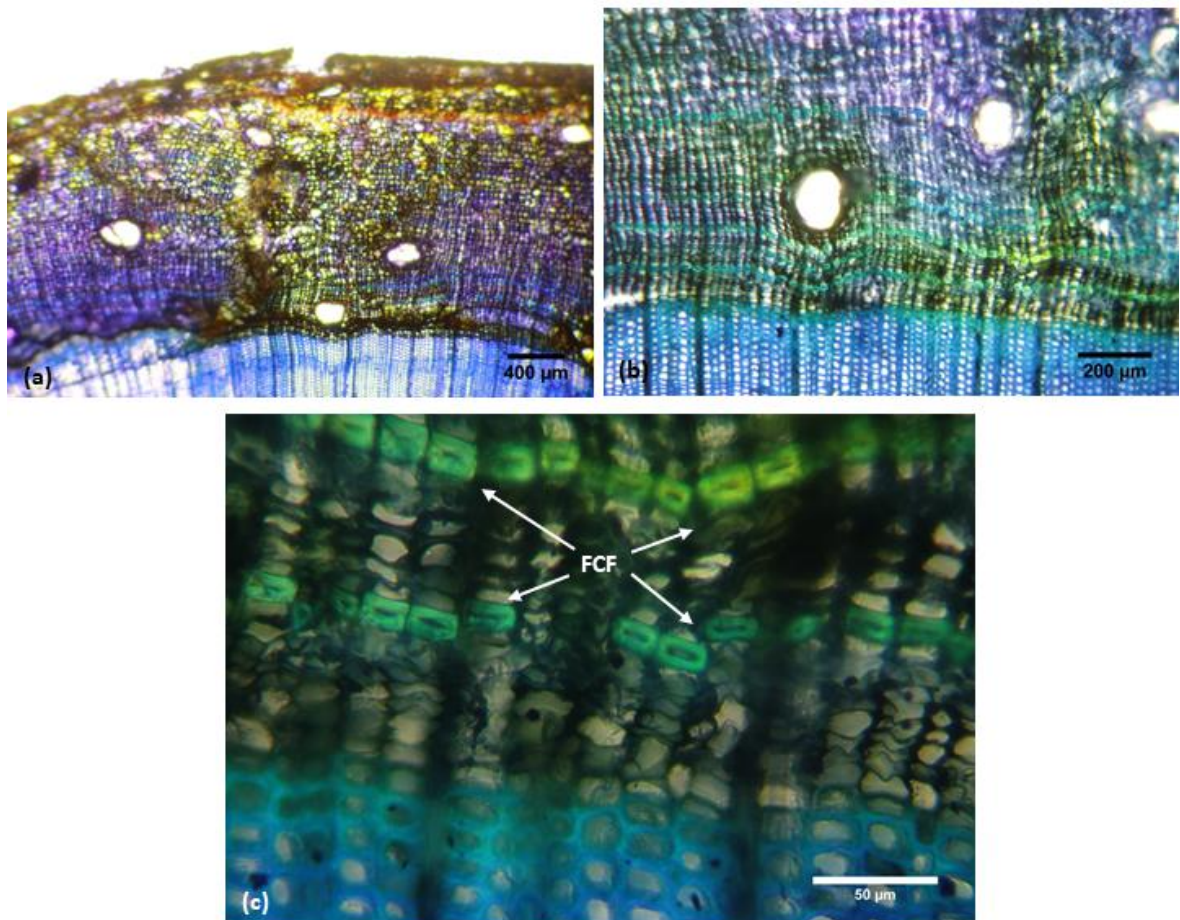


Figura 21. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri* tinción con azul de toluidina. **(a)** zona de avance de la lesión que denotó coloración amarillo-verdosa en las células del parénquima axial, indicando la presencia de compuestos fenólicos. **(b)** Zona media de la lesión con reacción positiva a la presencia de compuestos fenólicos (color verde turquesa) en las fibras floemáticas y en las células del parénquima axial. **(c)** Detalle de la zona media de la lesión del floema que muestra las fibras desordenadas y en color verde turquesa (presencia de compuestos fenólicos). FCF=fibras con depósitos de compuestos fenólicos.

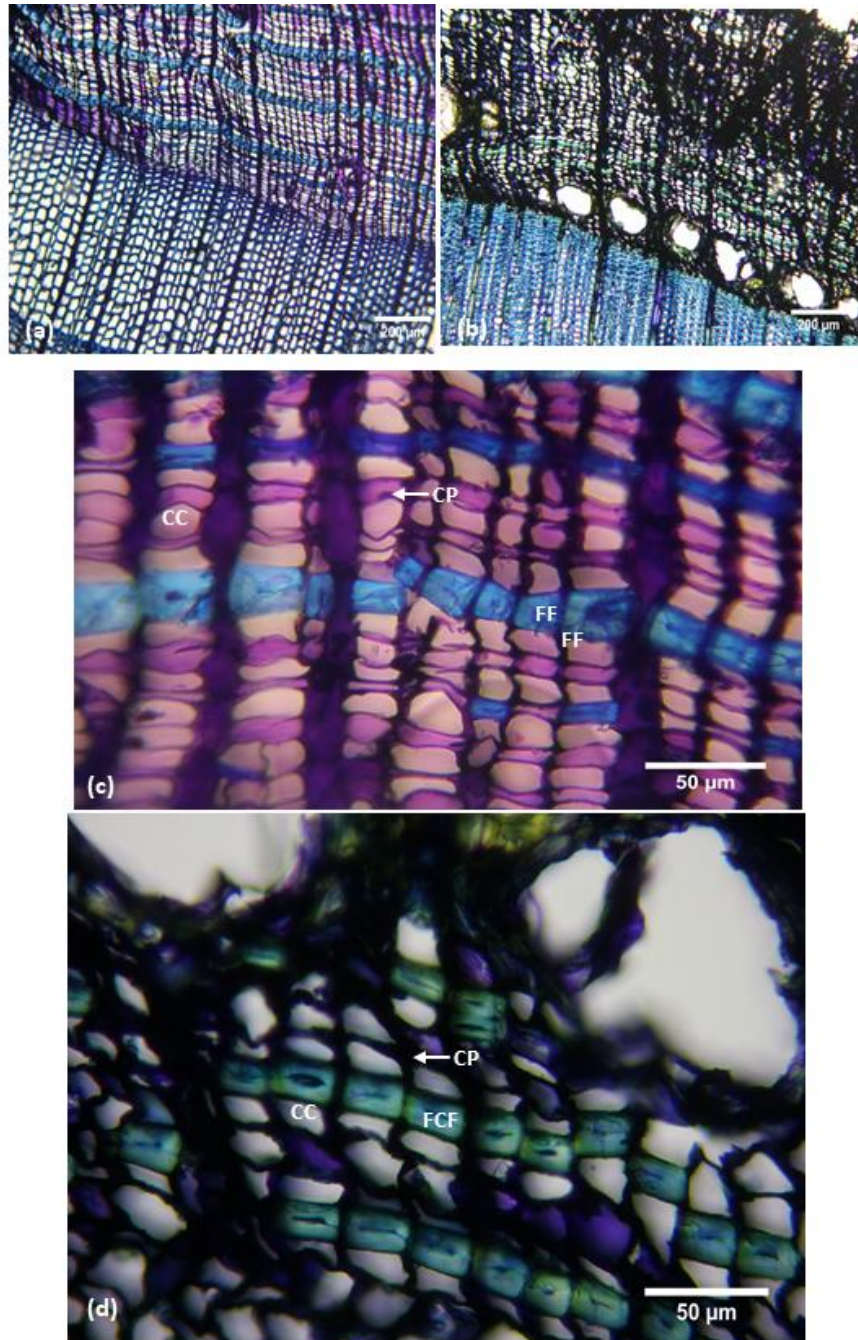


Figura 22. Sección transversal del tronco de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de toluidina. **(a)** Vista general del floema, cambium y xilema sano **(b)** Vista general del tejido afectado que adquiere una coloración oscura y pérdida de los contenidos de las células del parénquima axial. **(c)** Detalle del floema sano: se observan las células del parénquima axial (CP) en color rosado; las células cribosas (CC) y los radios en color lila. Las células del sistema parénquimático (axial y radial) indicando la presencia de carbohidratos y; células cribosas rosadas a blancas. Fibras de color celeste (FF). **(d)** Zona media de la lesión, donde se observan las células cribosas (CC) traslúcidas y las parenquimáticas colapsadas, sin contenidos celulares (pérdida de carbohidratos) y paredes oscuras; radios en color negro azulado y deposición de compuestos fenólicos (coloración turquesa) en las fibras floemáticas (FCF). CC=células cribosas; CP=células del parénquima axial; R=radio parenquimático; FF=fibra sana; FCF=fibras con depósitos de compuestos fenólicos.

Detección de taninos

En pruebas histoquímicas con vainillina, en sección transversal de árboles sanos se observó una mayor concentración de taninos hacia la zona de la peridermis, en las células subsidiarias de canales resiníferos normales, y en pocas células del parénquima axial del floema (coloración rojiza) (Fig. 23a,b). Las vacuolas de éstas células parenquimáticas contienen materiales de tinción densa conocidos como sustancias polifenólicas (Cheniclet et al. 1988), y por lo tanto se les ha denominado células de parénquima polifenólico (PP), una convención que usaremos también en este trabajo. El cambium vascular sano presentó un color rosado suave. En detalle se observó que las células del cambium además de adquirir ese color rosado suave, presentaron paredes enteras y turgentes. Las paredes de las fibras floemáticas se observaron de color amarillo hialino (tanto las de paredes gruesas como las de paredes finas) y las células parenquimáticas y cribosas de color rosado (Fig. 23c).

En el avance de la lesión se observó, tanto en el cambium necrosado como en toda el área afectada del floema, un cambio de coloración a rojo intenso, indicativo de un incremento en el contenido de taninos (Fig. 23d). En la zona media y más antigua de la lesión, la coloración se extendió tangencialmente en mayor proporción y de acuerdo al nivel de necrosis del cambium.

En la zona media de la lesión se observó una reacción positiva en las paredes celulares tanto del parénquima axial como del parénquima radial, cuyas células necrosadas y colapsadas se tiñeron de color rojo-magenta indicando acumulación de taninos. Las fibras del floema también mostraron reacción positiva, tiñéndose de color rosado-rojizo (Fig. 23e). La reacción observada en vainillina indicaría la presencia de taninos (compuestos fenólicos) en las paredes celulares del cambium vascular como así también en gran parte de los elementos floemáticos afectados (fibras y parénquima axial)

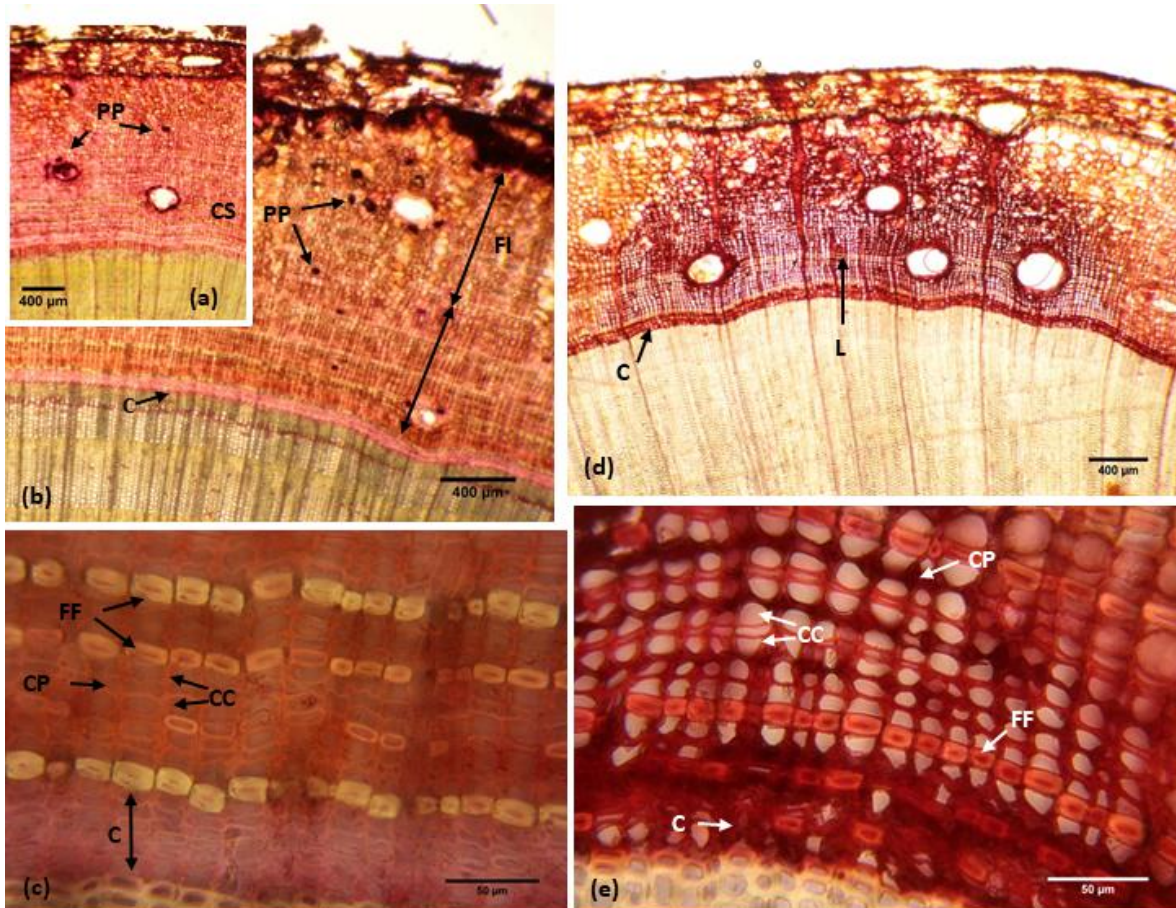


Figura 23. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años sana (a,b,c) e inoculada con *Phytophthora austrocedri* (d,e) en tinción con vainillina. **(a)** Células del parénquima polifenólico (PP) y células subsidiarias (CS) de canales resiníferos normales de color magenta oscuro indicando la presencia de compuestos tánicos. **(b)** Vista general del floema de color rojizo, las células del cambium forman una “banda” de color rosado. Hacia el floema inactivo y corteza se observa color rojizo oscuro (depósitos tánicos) y muy pocas células del parénquima axial con contenidos tánicos (PP). **(c)** Detalle del cambium y floema sano. Células parenquimáticas y cribosas turgentes de color rosado. Fibras de color amarillento hialino (tanto las de paredes gruesas como las de paredes finas). Cambium vascular rosado más claro. **(d)** Vista general de la zona de avance de la lesión; nótese el color rojo más intenso indicando la presencia de compuestos tánicos, en casi todos los elementos del tejido floemático y del cambium vascular afectado. **(e)** Zona media de la lesión, detalle del colapso total de las células del cambium vascular con intensificación de depósitos tánicos (rojo intenso). Esta situación se repite en las células del parénquima axial (colapso y depósito tánicos en sus paredes). También se denota un cambio de color en las paredes de las fibras floemáticas (anaranjadas). FI=floema inactivo; FA=floema activo; C=cambium; PP=células polifenólicas; CS=células subsidiarias; FF=fibras; CP=células parenquimáticas axiales; CC=células cribosas; L=lesión.

En la zona de transición, donde se produce esa deformación celular tipo “barrera”, el floema adquirió una coloración anaranjado-amarillenta, mientras que la zona sana fue de color rosado y con una mayor concentración de células PP. La zona correspondiente a la lesión adquirió un color rojo negruzco y no se observaron células PP en esa zona (Fig. 24b,c).

En zonas sanas del leño cercanas al avance de la lesión se observó una mayor cantidad de células PP, mientras que en el floema de plantas sanas se evidenciaron muy pocas células de este tipo Fig. 24a).

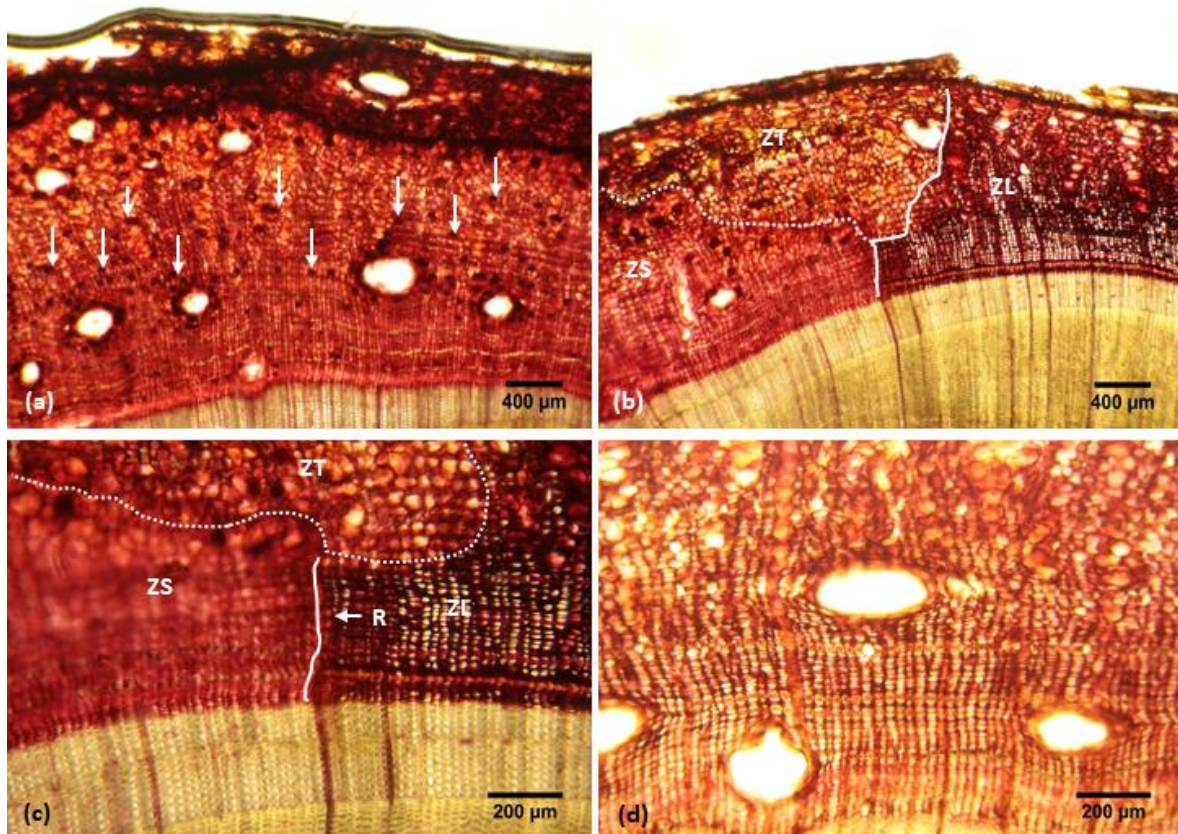


Figura 24. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri* en tinción con vainillina. **(a)** Floema sin lesión, cercano a la zona de avance de la lesión donde se observa una mayor cantidad de células PP con depósitos tánicos. **(b)** Zona de transición (ZT) entre la zona sana y afectada de color anaranjada con células deformadas que conforman la zona "tipo barrera". Hacia la zona sana (ZS) se observa una mayor concentración de células PP, mientras que en la zona de la lesión (ZL) no se observaron y la coloración se tornó rojo negruzco. **(c)** Zona límite entre floema sano y afectado. Observe el avance uniforme marcado por los radios parenquimáticos como un incipiente efecto de compartimentalización en el avance de la lesión (línea continua). En la parte superior de la microfotografía, se encuentra la zona de transición con células deformadas que marcan la "zona tipo barrera". **(d)** Zona lesionada donde se observa la pérdida de compuestos tánicos de las células subsidiarias de los canales resiníferos. ↓=células parénquima polifenólicas (PP) ZT=zona de transición; ZS=zona floema sano; ZA=zona afectada; R=radio parenquimático.

Por otra parte, se observó la pérdida de los compuestos tánicos de las células subsidiarias de los canales resiníferos que fueron observados en el floema sano (Fig. 24d).

En los árboles adultos la concentración de compuestos tánicos se hizo más evidente en la zona más antigua de la lesión, en el sistema parenquimático del floema y fibras (Fig. 25a-d)

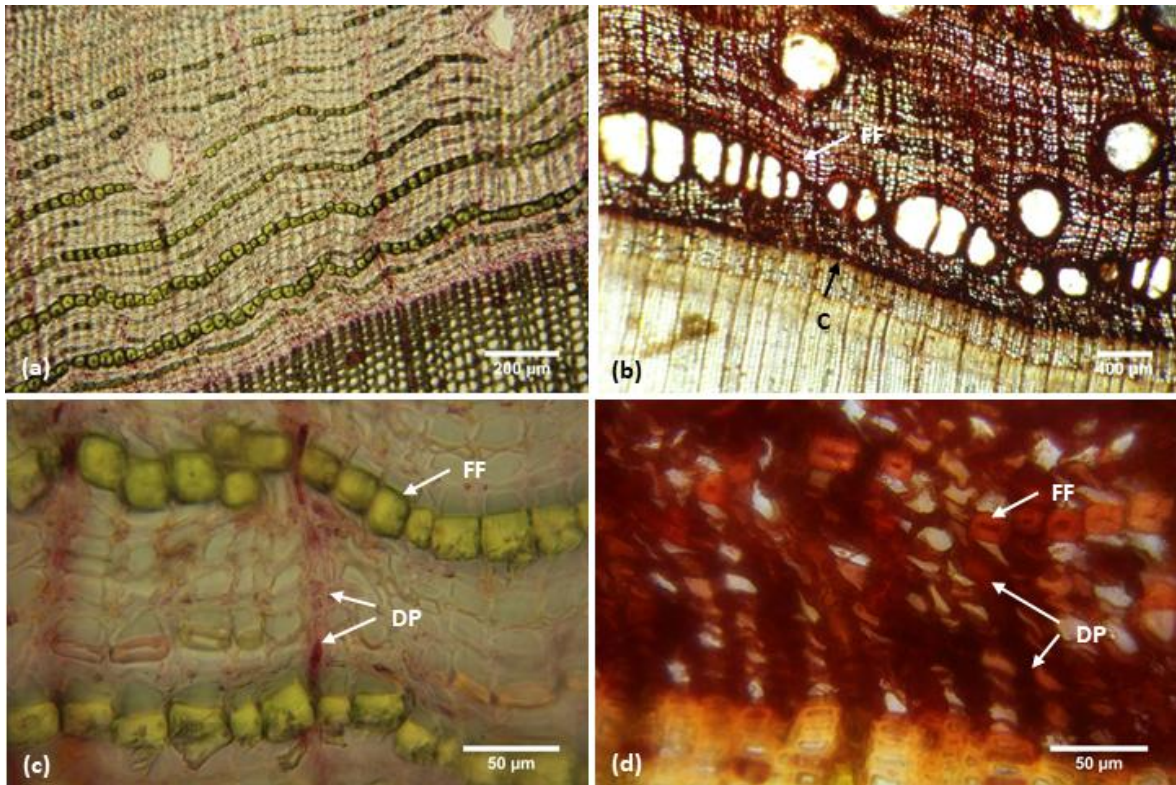


Figura 25. Sección transversal del tronco de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro sano (a y d) e infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri* (b y d), en tinción con vainillina. **(a)** Vista general del floema, cambium y xilema sano con casi nula presencia de compuestos tánicos (color magenta oscuro). **(b)** Vista general de la zona más antigua de la lesión con depósitos tánicos principalmente en las células del parénquima axial y radial. Las fibras también reaccionaron positivamente. **(c)** Detalle del floema sano con escasa presencia de compuestos tánico en el sistema radial. **(d)** Detalle en la zona más antigua de la lesión con gran cantidad de depósitos tánicos, tanto en el cambium como en el floema. En este último tejido la coloración magenta (depósitos tánicos) se observa en todo el sistema parenquimático y también en las paredes de las fibras se denota un cambio de color (rosado). C=cambium; DP=depósitos tánicos (compuestos fenólicos); FF=fibras.

Detección de lignina

En el estudio histoquímico para la detección de lignina en plantas sanas, se observó, en sección transversal, una reacción positiva (rojo/púrpura) para traqueidas y fibras floemáticas (Fig. 26a). El resto de los elementos floemáticos y el cambium vascular adquirieron un color amarillo dorado y amarillo claro respectivamente. La Fig. 26b muestra en detalle la reacción positiva de lignina en fibras floemáticas tanto de paredes gruesas como delgadas, mientras que las paredes y contenidos de las células cribosas y parenquimáticas se observan de color amarillo.

En la zona de avance de la lesión se pudo observar el cambio de coloración que evidenciaron las células cambiales en floroglucinol que, en lugar del color amarillo claro del tejido sano, mostraron un color marrón claro al igual que los elementos parenquimáticos y cribosos del floema (Fig. 26c). Los radios parenquimáticos establecieron un tipo de límite o línea entre la zona sana y necrosada. Esta línea definida que se observó en varias oportunidades en el avance de la lesión; podría ser una reacción del ciprés al avance de *P. austrocedri* tratando de poner un límite para compartimentalizar el área afectada (Fig. 26c,d).

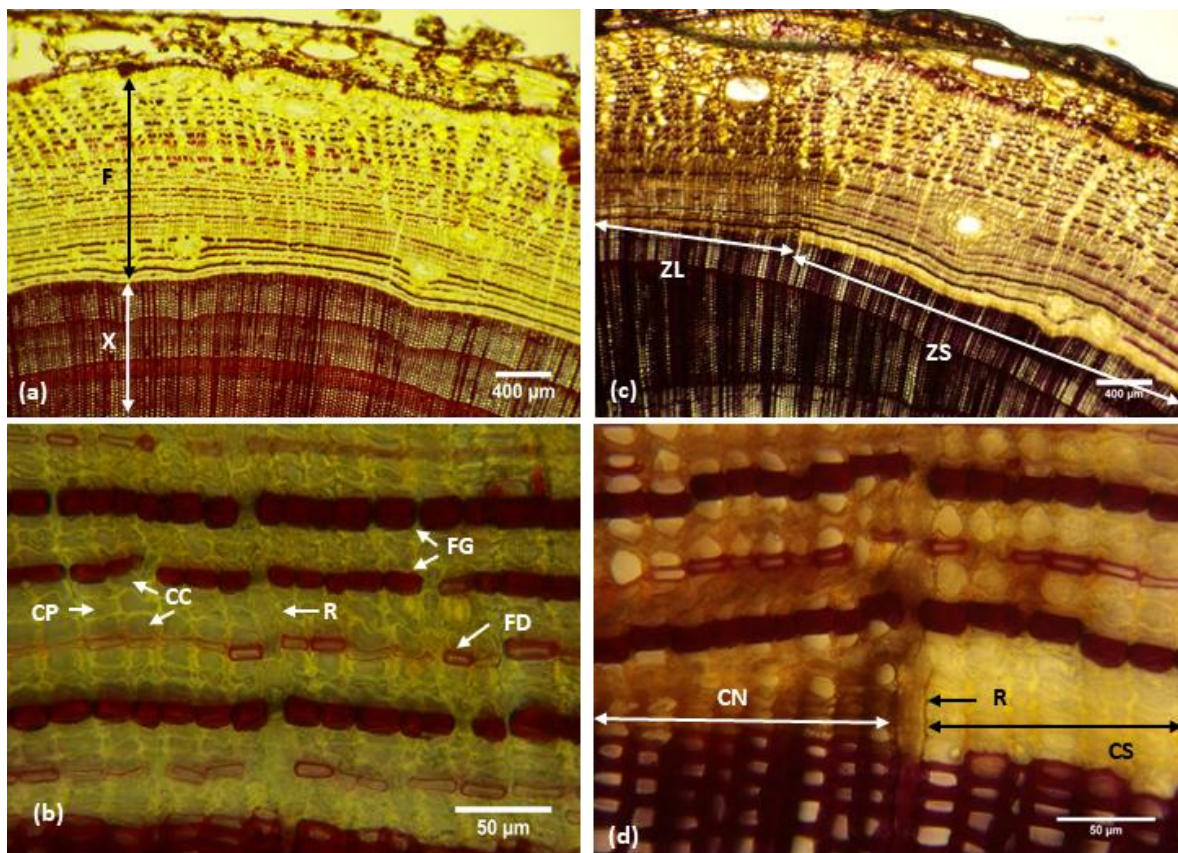


Figura 26. Sección transversal del tallo de planta sana de *Austrocedrus chilensis* de 8 años (a y b) e inoculada con *Phytophthora austrocedri* (c y d) en tinción con floroglucinol. **(a)** Vista general del leño y floema sano, reacción positiva presencia de lignina en el xilema y fibras floemáticas (color rojo/púrpura), cambium y floema se colorearon en amarillo. **(b)** Detalle de la prueba de lignina en floema. Color rojo/púrpura, en fibras floemáticas de paredes gruesas (FG) y delgadas (FD). Parénquima axial (CP), radial (R) y células cribosas (CC), color amarillento. **(c)** En la zona de avance de la lesión donde se observa un cambio de coloración en el cambium y floema entre la zona sana y lesionada. Esta última cambio de color amarillo-brillante, a marrón oscuro. Se mantiene la reacción positiva para lignina en el xilema y fibras floemáticas. **(d)** Diferencia de coloración y forma celular entre el cambium sano (color amarillo) y el cambium necrosado (color marrón). El límite entre ambas zona lo establece el radio parenquimático que define un borde de avance uniforme (incipiente compartimentalización). X=xilema; F=floema; C=cambium; CC=células cribosas; CP=células parénquima axial; R=radio parenquimático; ZS=zona sana; ZL=zona lesionada; FD=fibras de paredes delgadas; FG=fibras de paredes gruesas; CC=células cribosas; CP=células parenquimáticas; CS=cambium sano; CN=cambium necrosado; R=radio parenquimático.

Teniendo en cuenta que en la detección de taninos (compuestos fenólicos) estas mismas células del cambium reaccionaron positivamente y que en la prueba con floroglucinol mostraron reacción negativa manteniendo su coloración marrón debido a la necrosis, podríamos inferir que son compuestos fenólicos distintos a la lignina.

Con esta técnica de histoquímica se registró muy bien la disminución en espesor que sufre el cambium vascular por la necrosis y colapso celular, produciendo un angostamiento y desordenamiento de los elementos de conducción, en la zona de transición entre el floema sano y lesionado (Fig. 27a).

En la lesión media, se observó más acentuado ese cambio de coloración (de amarillo a marrón) de las células parenquimáticas tanto axiales como radiales; y de las células cribosas, que estaban deformadas, necrosadas y colapsadas. (Fig. 27b).

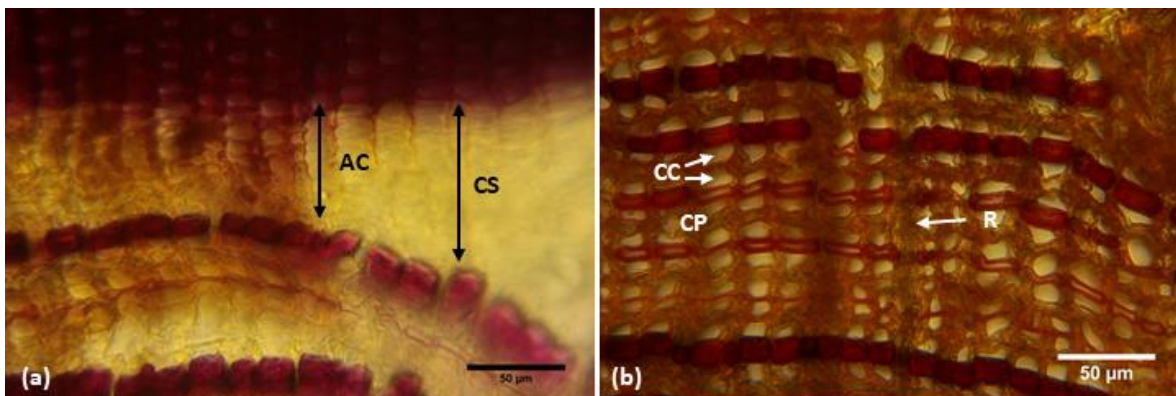


Figura 27. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri* en tinción con floroglucinol. **(a)** Zona de transición entre el floema sano y lesionado. Se observa el cambio de coloración (de amarillo a marrón) y una disminución en espesor del tejido por la compresión y necrosis en la zona lesionada. **(b)** Zona media de la lesión con reacción positiva de lignina en la fibras floemáticas (coloración rojo/púrpura). El resto de los tejidos floemático de color marrón, con necrosis y colapso y deformación de sus elementos (células cribosas (CC), parenquimáticas (CP) y radiales (R). AC=angostamiento del cambium necrosado; CS=cambium sano; CP=células del parénquima axial; CC=células cribosas; R=radio parenquimático .

No se observaron cambios para los elementos con lignina (fibras), comparando el floema sano con el floema afectado mediante la prueba con floroglucinol (Fig. 28 a-d).

Las células parenquimáticas (radiales y axiales) y células cribosas, mantuvieron el color marrón de la necrosis. El cambio de coloración de estas células dio positivo en los ensayos para detección de taninos y compuestos fenólicos, por lo que

podría suponerse que los compuestos fenólicos depositados son diferentes a la lignina.

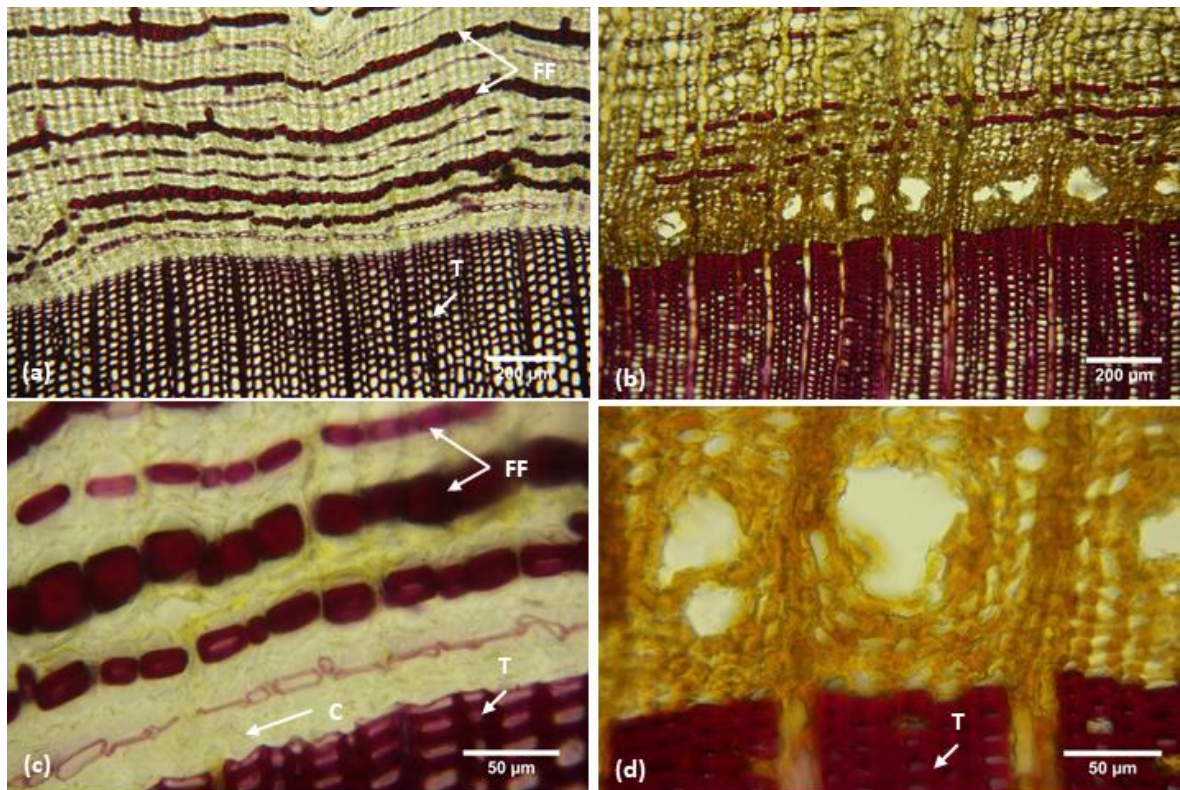


Figura 28. Sección transversal del tronco de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro sano (a y c) e infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri* (b y d), en tinción con floroglucinol. **(a)** Vista general del floema, cambium y xilema con reacción positiva a la presencia de lignina en fibras floemáticas y traqueidas. El resto del tejido floemático y cambium sin tinción (blanco hialino). **(b)** Zona media de la lesión donde se mantiene la reacción positiva de la lignina en fibras y traqueidas pero el resto del tejido floemático adquiere un color ocre-marrón. **(c)** Detalle del floema y cambium sano, en color blanco hialino. Fibras floemáticas (FF) y traqueidas rojas por la presencia de lignina. **(d)** Detalle del floema y cambium en la zona media de la lesión de color marrón y células deformadas y colapsadas. Se mantiene la reacción positiva para lignina (rojo/púrpura) en el xilema y fibras floemáticas (FF). FF=fibras floemáticas; T=traqueidas; C=cambium.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Los resultados y discusiones planteadas hasta aquí, en referencia a la necrosis y alteraciones del cambium vascular y del floema del ciprés de la cordillera, afectado por *Phytophthora austrocedri* también se vieron reflejados en los estudios con MEB (Fig. 29a,b y 30a,b).

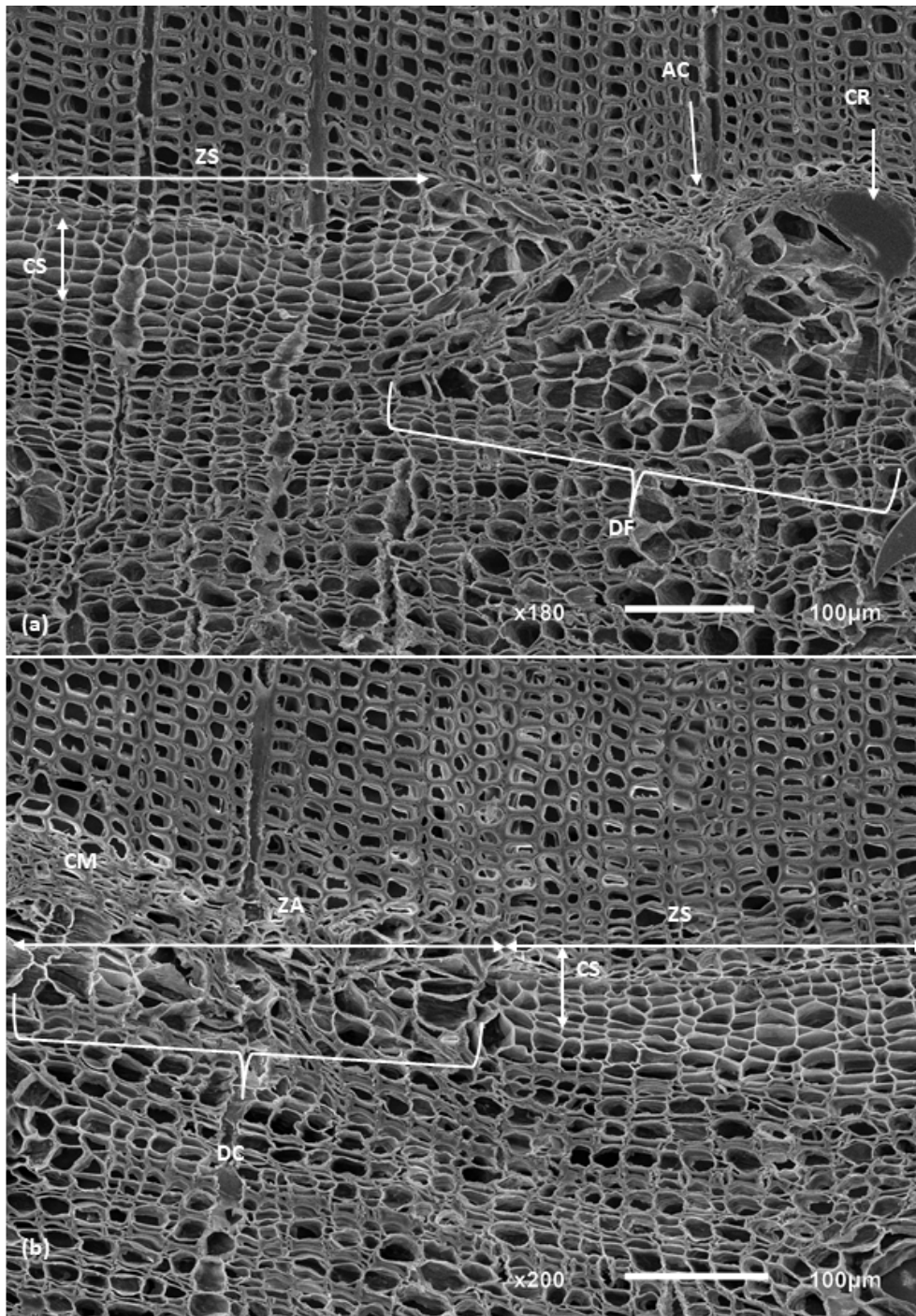


Figura 29. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri*, MEB. **(a)** Angostamiento del cambium vascular por necrosis y colapsos de sus células. Se observa el resultado de la reprogramación celular hacia el tejido floemático (deformaciones e inicio de formación de canales resiníferos). **(b)** Otra zona de transición entre cambium vascular y floema sano; y cambium necrosado. Obsérvese el angostamiento del cambium y del floema por el colapso celular y la deformación general de sus células en la zona lesionada. ZS=zona sana; ZA=zona afectada AC=angostamiento del cambium; DC=deformación celular del cambium y del floema; CS=cambium sano; CR=canal resinífero; CS=cambium sano; AC=angostamiento del cambium, CM=cambium muerto; DF=deformación de las células del floema.

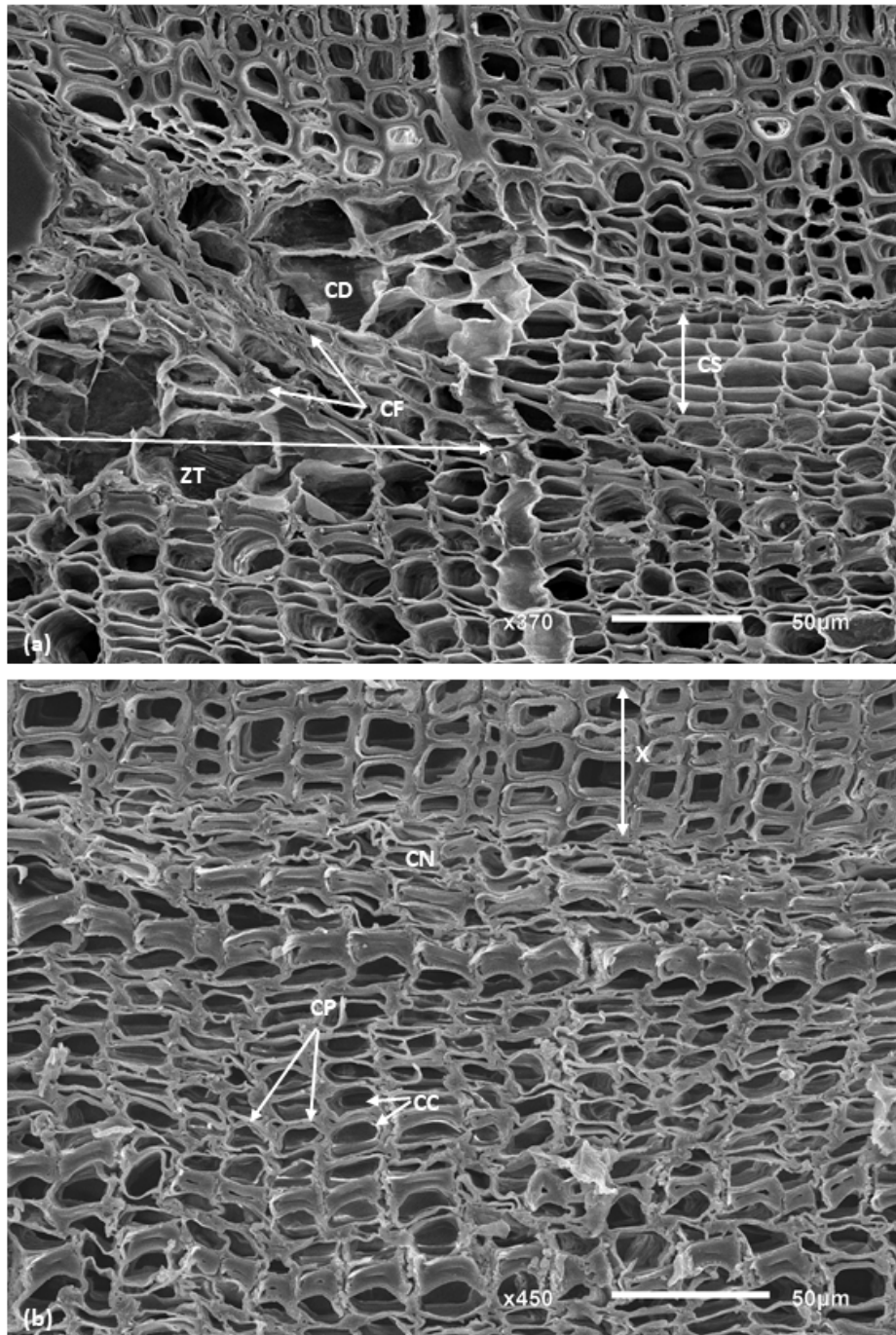


Figura 30. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculada con *Phytophthora austrocedri*, MEB. **(a).** Detalle de la deformación de las células del floema y del cambium en el avance de la lesión. Se observa la compresión del sistema de fibras por el angostamiento hacia la zona del cambium deformado (necrosado) y el desordenamiento de la células parenquimáticas y cribosas formando la zona tipo barrera. **(b)** Floema lesionado. Necrosis y colapso del sistema parenquimático axial y células cribosas sin contenidos. CS=cambium sano; CD=cambium deformado; CF=compresión de fibras (zona de angostamiento del floema); ZT= zona de transición tipo barrera, deformación de células cribosas y parenquimáticas; CN=cambium necrosado; F=fibras; CP= células del parénquima axial colapsadas; CC=células cribosas; X=xilema.

En MEB se pudo observar el detalle de la conformación de los canales resiníferos traumáticos del floema y corteza, además de la obturación con resina de las células del parénquima axial y de las células cribosas de éste tejido de conducción (Fig. 31a,b). La producción de resina de los conductos traumáticos, también se transfería hacia el tejido xilemático, a través de los radios parenquimáticos y canales resiníferos radiales, ocasionando el taponamiento de las traqueidas del último anillo de crecimiento (Fig. 31c). Esta situación se observó tanto en árboles adultos infectados naturalmente como en las plantas jóvenes inoculadas artificialmente.

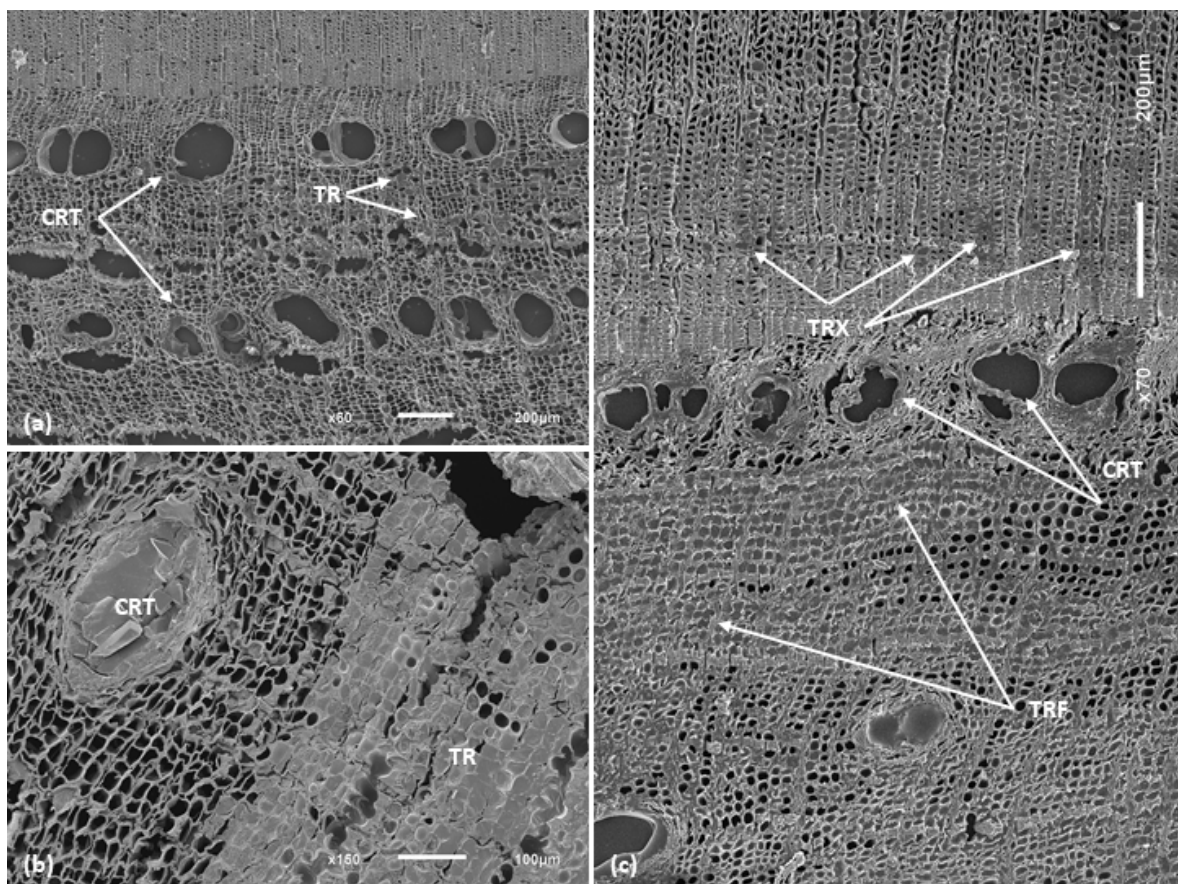
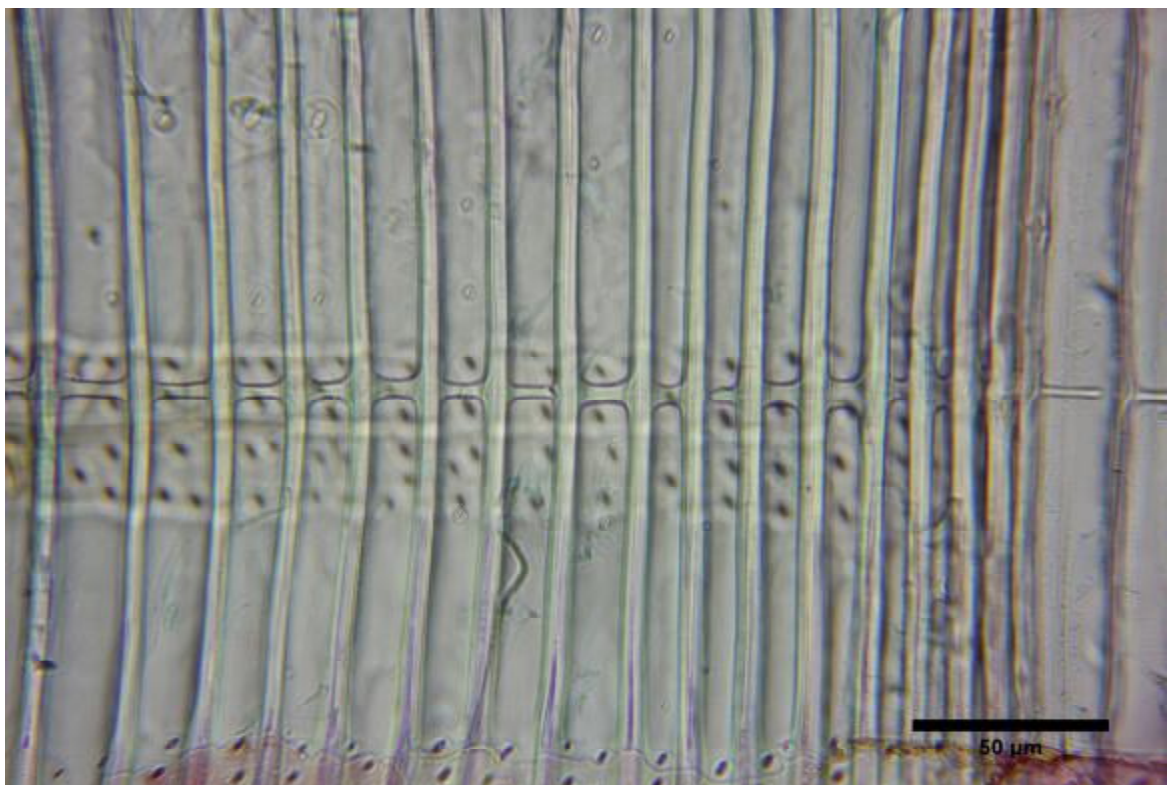


Figura 31. Sección transversal del tronco de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro afectado infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, MEB. **(a)** Zona media de la lesión, conformación de canales resiníferos traumáticos en filas dobles, y la obturación con resina (TR) de las células del parénquima axial y de las células cribosas por el exceso de resina producido en dichos canales. **(b)** Detalle de la situación descrita anteriormente, donde se observa el taponamiento con resina de los elementos de conducción del floema. **(c)** Se observa la conformación de los canales resiníferos traumáticos y cómo, el exceso de resina que éstos producen, se transfieren en sentido radial, a través de los radios parenquimáticos tanto hacia el floema como hacia el xilema; ocasionando el taponamiento de éstos tejidos. CRT=canal resinífero traumático; TR=taponamientos con resina; TRF=taponamientos con resina en el floema; TRX=taponamiento con resina en el xilema.

**ALTERACIONES DEL XILEMA DE *Austrocedrus chilensis*
AFECTADO POR *Phytophthora austrocedri***



FORMACION DE TRABÉCULAS

Las características del xilema observadas en ejemplares sanos, tanto adultos como jóvenes, coincidieron en lo general con las descritas por otros autores para el ciprés de la cordillera (Tortorelli, 1956, 2009; Roig, 1992; Guerra et al. 1994; García et al. 2004). Por lo tanto en los resultados se detallan solamente aquellos aspectos relevantes para su comparación con el tejido afectado.

En las observaciones del leño de árboles sanos de ciprés realizadas en este trabajo, no se encontraron trabéculas en ningún caso. Mientras que en el xilema asociado a las lesiones necróticas del cambium y del floema el 100% de las 135 muestras analizadas, provenientes de 6 árboles, presentaron gran cantidad, frecuencia y diversidad de trabéculas. Las trabéculas se presentaron en forma de varillas solitarias (Fig. 32a), como así también en filas simples cortas a muy largas que atraviesan dos o más células sucesivas radialmente (Figuras 32b,c). Las alineaciones simples llegaron a atravesar hasta cincuenta y dos traqueidas (Fig. 33a,b). Se observaron 9 tipos distintos de trabéculas en el leño afectado, teniendo en cuenta las descripciones de Grosser (1986): 1) trabécula solitaria; 2) alineación o fila corta de 2 a 3 trabéculas en traqueidas adyacentes, 3) alineación de trabéculas que atravesaban la madera temprana 4) y madera tardía (Fig. 32b y 33c), 5) trabécula solitaria doble; 6) alineación doble (Fig. 34a), 7) alineación triple (Fig. 34b), 8) Trabécula solitaria en forma de placa (Fig. 34d), 9) alineación de trabéculas en forma de placa o fila en “confluencia” (Fig.34c).

El avance de la lesión fue la zona en donde más se manifestó la formación de diferentes tipos de trabéculas (en varilla y en forma de placa o plato) (Fig. 34c).

Se observaron alineaciones de trabéculas simples desde la lesión en la zona del floema hacia las traqueidas del xilema (Fig. 34e).

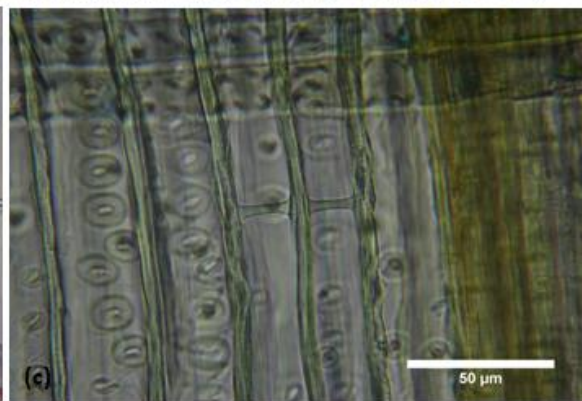
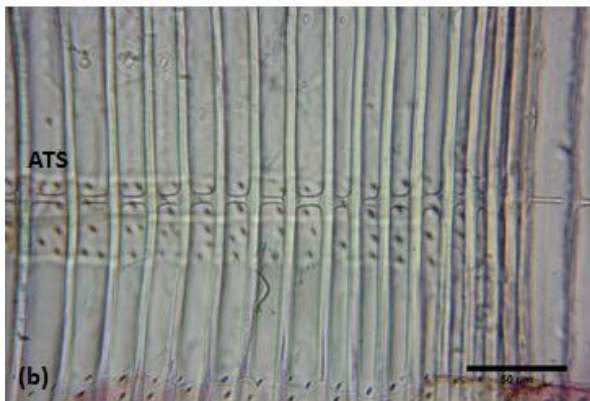
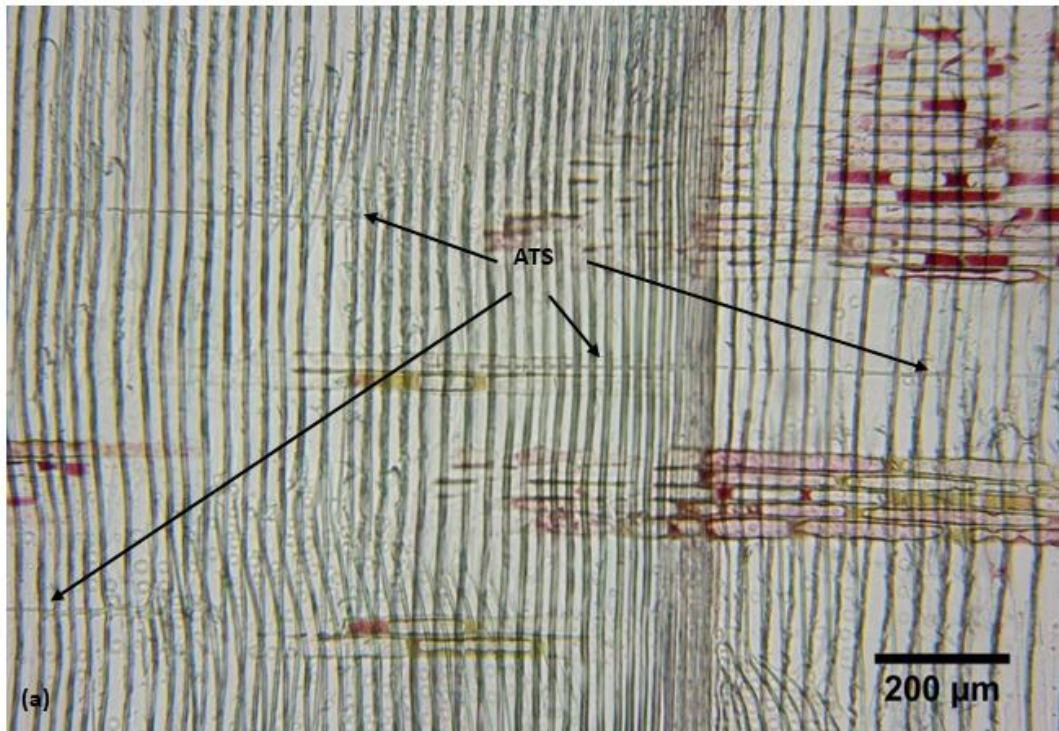


Figura 32. Sección radial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri* con diferentes tipos de trabéculas, tinción con azul de algodón. **(a)** Distribución de trabéculas en alineaciones simples (ATS), tanto en leño temprano como tardío. **(b)** Detalles de trabéculas en alineación simple, en traqueidas del leño tardío y leño temprano. **(c)** Fila simple corta, atravesando dos traqueidas. ATS=alineación de trabéculas simples

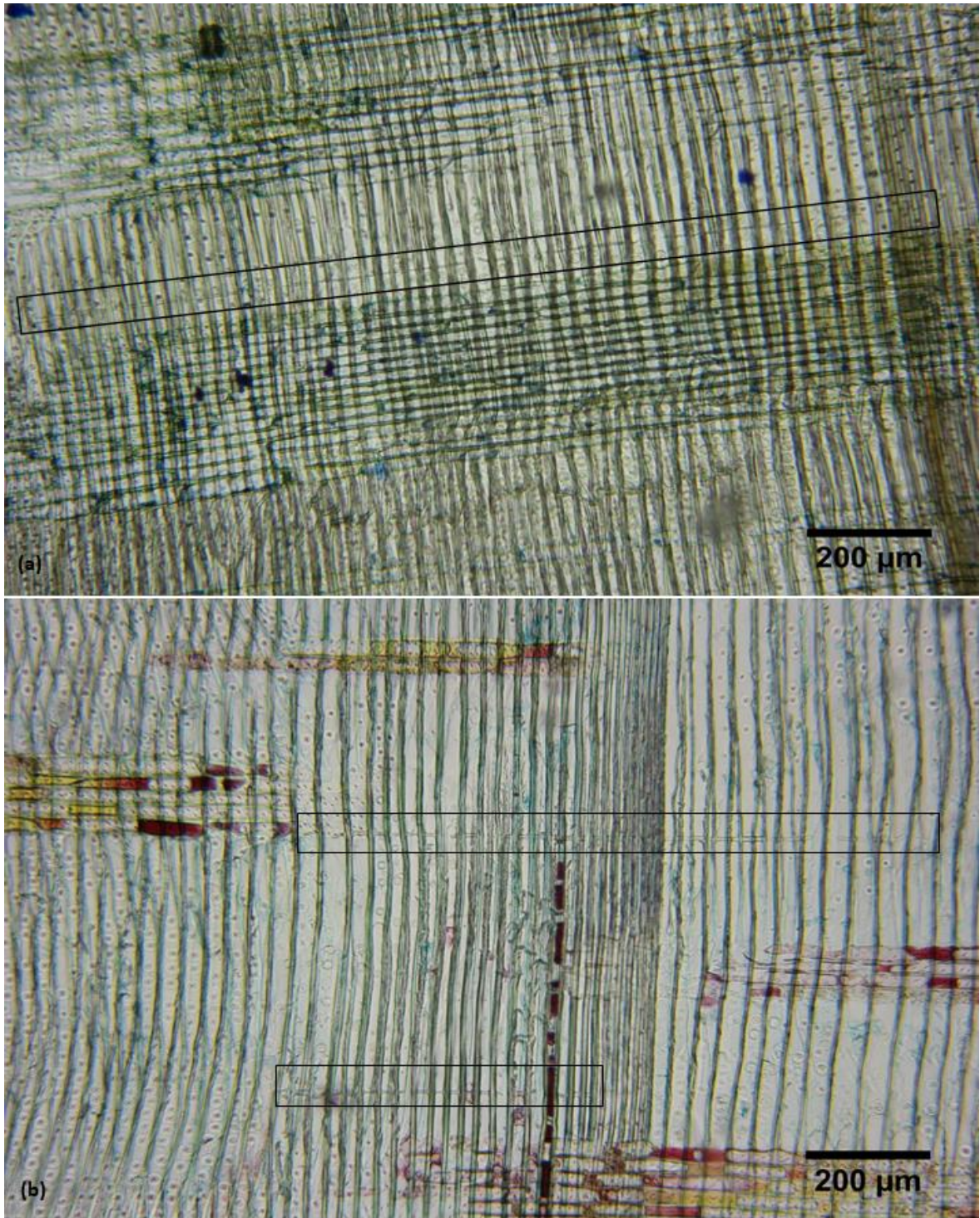


Figura 33. Sección radial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri* con diferentes tipos de trabéculas, tinción con azul de algodón. **(a)** Alineación de trabéculas simples (ATS) atravesando 52 traqueidas (leño temprano y tardío). **(b)** ATS que atraviesan 35 y 25 traqueidas respectivamente.

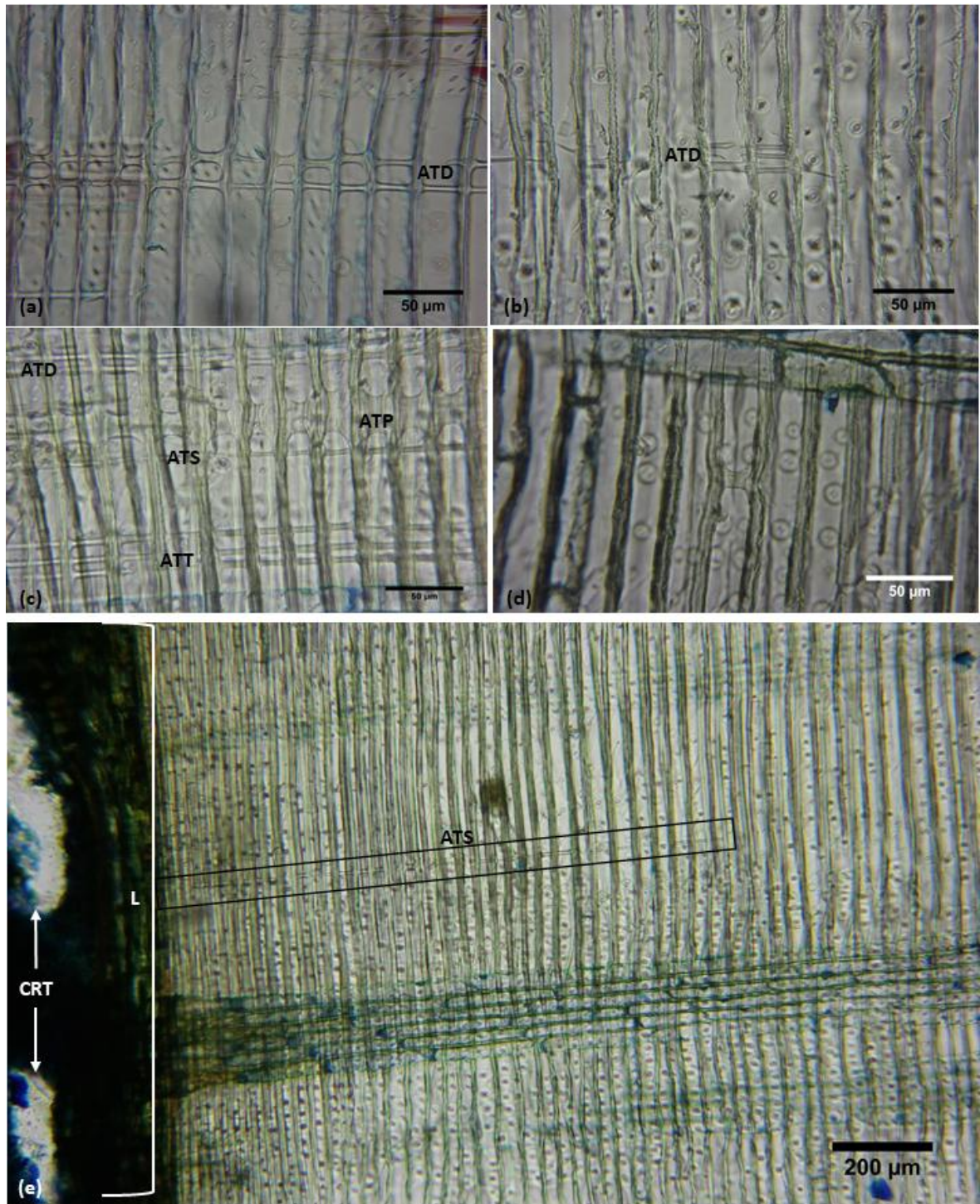


Figura 34. Sección radial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri* con diferentes tipos de trabéculas, tinción con azul de algodón. **(a)** Trabéculas en alineaciones dobles (ATD). **(b)** Alineaciones de trabéculas triples (ATT). **(c)** Distribución de trabéculas en alineaciones simples (ATS), dobles (ATD), triples (ATT) y tipo placa (ATP). **(d)** Trabécula solitaria en forma de placa. **(e)** Alineación de trabéculas simple (ATS) desde la lesión del cambium y del floema hacia las traqueidas del xilema.

DEFORMACIONES DE RADIOS Y TRAQUEIDAS

En el leño asociado a la zona límite de la lesión necrótica del floema de ciprés afectado por *P. austrocedri*, se observó la deformación de traqueidas y radios parenquimáticos. Estas deformaciones, en sección transversal, consistieron principalmente en el ensanchamiento de los radios parenquimáticos, engrosamiento de las paredes celulares y cambio de forma de las traqueidas. Esto fue observado tanto en plantas jóvenes inoculadas artificialmente (Fig. 35a,b) como en ejemplares adultos afectados naturalmente. (Fig. 35c).

La desorganización del tejido xilemático se extendió tangencialmente sobre los últimos anillos de crecimiento (Fig. 35d). En la zona conformada por radios y traqueidas deformadas también se observó la obturación del lumen de las traqueidas debido al traspaso de contenidos de los radios parenquimáticos principalmente resiníferos (Fig. 35e).

Los resultados de este trabajo confirman la obturación de las traqueidas por contenidos resinosos volcados desde los radios tanto en ejemplares jóvenes inoculados artificialmente como en ejemplares adultos afectados naturalmente.

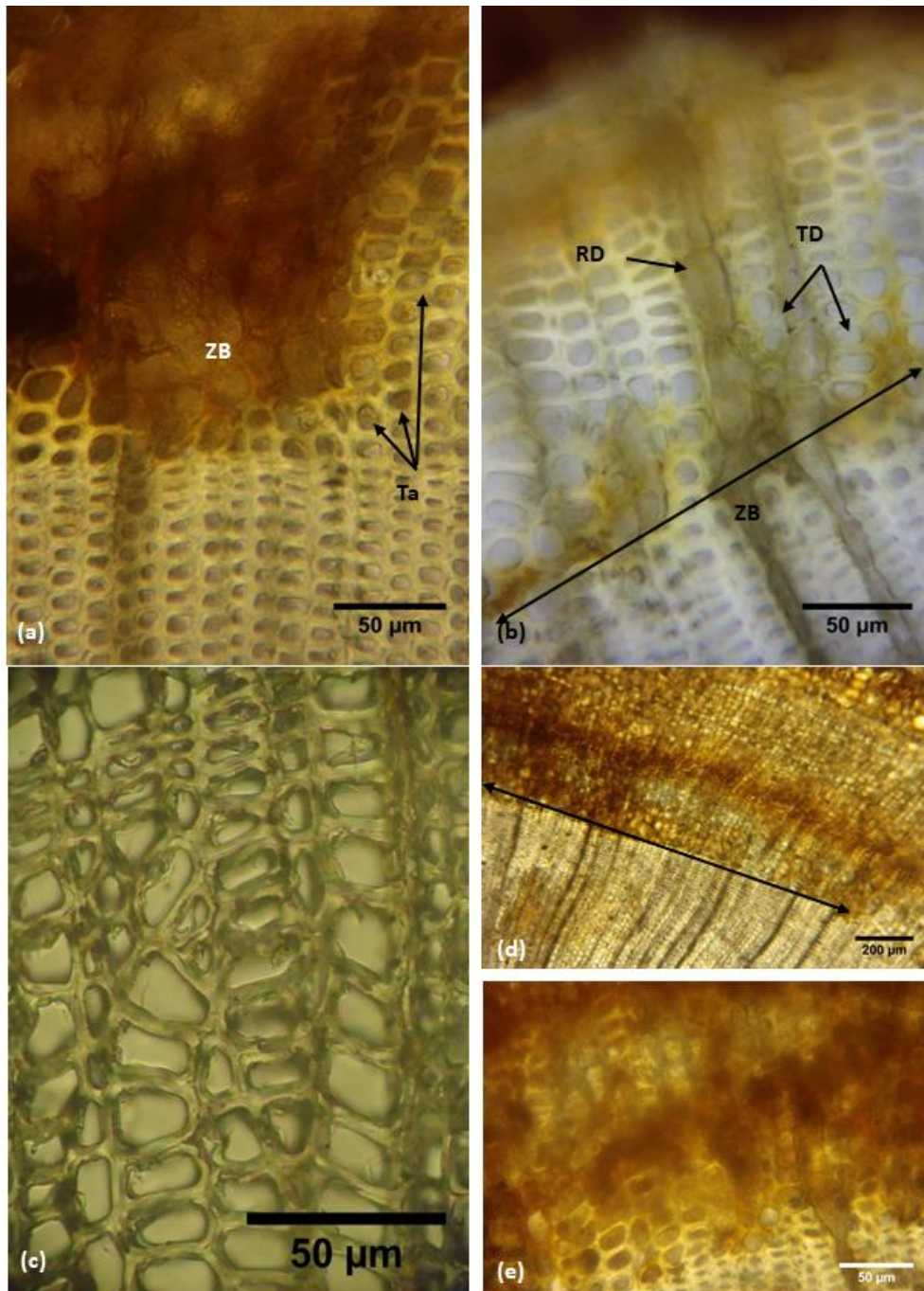


Figura 35. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad, inoculada con *Phytophthora austrocedri* a y b, *A. chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente con *P. austrocedri*, c; montaje en agua microscopía de campo claro. **(a)** Conformación de la zona «tipo barrera» (ZB) en la zona límite de la lesión por la deformación de radios y traqueidas. Se observan contenidos obturando las traqueidas adyacentes no deformadas (Ta). **(b)** Detalle de la deformación de radios (RD) y traqueidas (TD), que van conformando una malformación general del tejido xilemático «tipo barrera» (ZB). **(c)** Leño con traqueidas del leño temprano (de primavera-verano) deformadas. **(d)** Deformación de radios y traqueidas en el último anillo de crecimiento. **(e)** Obturación de las traqueidas con contenidos resinosos volcados desde los radios. Detalle de ZB= zona «tipo barrera» conformada por deformaciones celulares; RD=radios deformados ; TD=traqueidas deformadas.

ANALISIS HISTOQUIMICO

Detección de almidón

La detección de almidón mediante la prueba histoquímica con lugol, arrojó resultado positivo en el leño sano de ciprés. La concentración de este carbohidrato se observó principalmente en los radios parenquimáticos. (Fig. 36a,b). Mientras que en el leño afectado con *P. austrocedri*, se observó una pérdida importante de almidón en éstos elementos (Fig. 36c,d). Esta situación se vio acentuada en aquellos radios que reaccionaron y sufrieron deformación celular (células agrandadas) (Fig. 36e).

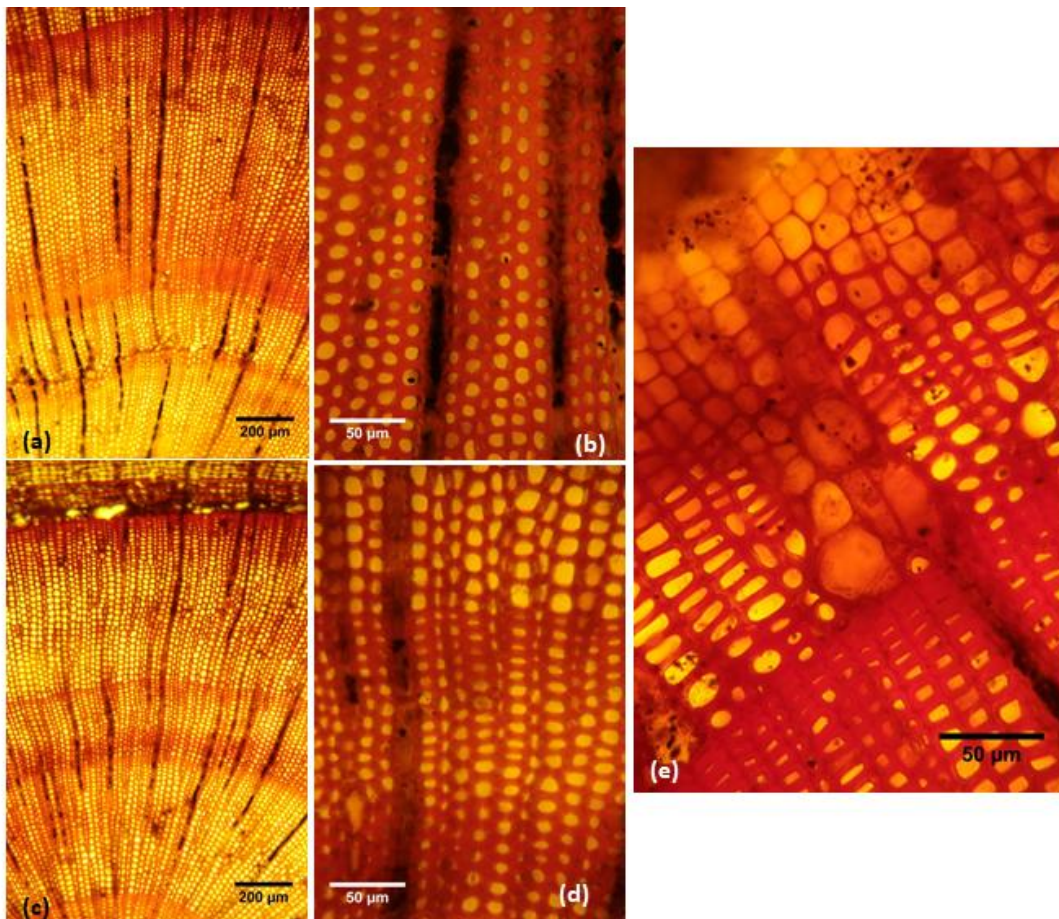


Figura 36. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad sana (a,b), e inoculada (c,d,e) con *Phytophthora austrocedri*, en tinción con lugol. Comparación del contenido de almidón entre el xilema sano y afectado. (a) y (b) Xilema sano en diferentes aumentos que muestra la concentración de almidón en los radios parenquimáticos (coloración negro-azulada). (c) y (d) Xilema afectado por *P. austrocedri* donde se observa la pérdida de almidón en los radios parenquimáticos. (e) Detalle de la deformación de radios (células agrandadas) con pérdida total de almidón.

Detección de compuestos fenólicos

En tinción con azul de toluidina el xilema sano se observó en color azul y los radios parenquimáticos en color negro azulado (Fig. 37a) mientras en el xilema afectado, la tinción mostró una coloración no homogénea en los radios parenquimáticos, donde se observaban zonas sin colorear, posiblemente por la pérdida y/o cambio en sus contenidos (Fig. 37b).

Detección de taninos

En pruebas histoquímicas con vainillina, en sección transversal, en el xilema de árboles sanos se observó muy poca concentración de taninos, los cuales se ubican en los radios parenquimáticos (Fig. 37c). Sin embargo, en los ejemplares afectados tanto adultos como jóvenes, se observó una mayor cantidad de contenidos tánicos en los radios, evidenciados por la coloración más oscura. Estos contenidos fueron volcados hacia las traqueidas adyacentes produciendo la obturación de las mismas (Fig. 37d). Esta situación va en incremento desde la zona de avance hacia la zona más antigua de la lesión.

Detección de lignina

En el estudio histoquímico para la detección de lignina en el xilema de árboles y plantas jóvenes sanas, se observó en sección transversal una reacción positiva para las traqueidas (rojo/púrpura) y los contenidos de los radios parenquimáticos (color rosado) (Fig. 37e). No obstante, en todas las observaciones tanto de árboles adultos como jóvenes en las zonas lesionadas, los radios parenquimáticos adquirieron un color ocre/marrón con células necrosadas y deformadas (Fig 37f).

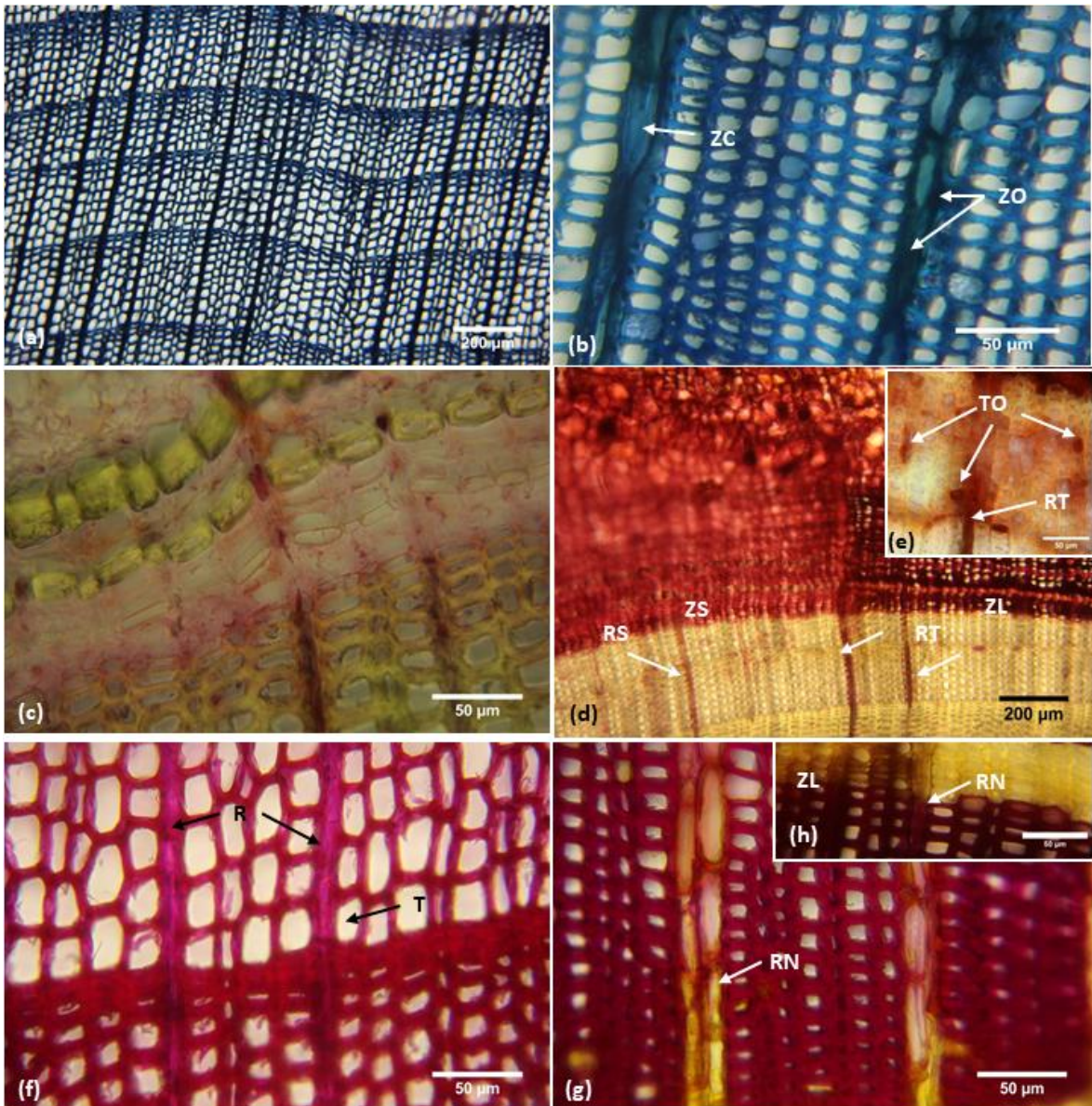


Figura 37. Sección transversal del tronco de árbol adulto (a-c, e-g) y planta joven (d,h) de *Austrocedrus chilensis*; en tinción con azul de toluidina, vainillina y floroglucinol. **(a)** Xilema sano en tinción con azul de toluidina mostrando traqueidas en color azul y radios parenquimáticos en negro azulado denotando la presencia de carbohidratos. **(b)** Zona de la lesión en tinción con azul de toluidina que muestra una coloración no homogénea en los radios xilmáticos por el cambio de contenido. **(c)** Floema, cambium y xilema sano en tinción con vainillina. Este último tejido muestra poca concentración de compuestos tánicos en los radios (color magenta). **(d-e)** Tejidos de ejemplares afectados en tinción con vainillina. **(d)** Planta joven con zona afectada (ZL) y sana (ZS), la coloración indica mayor contenido tánicos en los radios afectados (RT) que en los sanos (RS). **(e)** Xilema lesionado de árbol adulto con concentración de contenidos tánicos en los radios parenquimáticos (RT) los cuales obturan las traqueidas adyacentes (TO). **(f)** Leño sano en tinción con floroglucinol traqueidas (rojo/púrpura) y radios en color rosado. **(g)** Xilema afectado donde los radios parenquimáticos cambian a un color ocre/marrón (RN). **(h)** Planta joven en zona lesionada que presenta radios ocre/marrón (RN). ZC=zonas claras; ZO=zonas de coloración oscuras; R=radios xilemático; T=traqueida; TO=traqueidas obturadas con contenidos tánicos; RS= radios con muy pocos contenidos tánicos; RT=radios con acumulación de contenidos tánicos; ZS=zona sana; ZL=zona lesionada; RN=radios necrosados.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Los resultados obtenidos hasta aquí, en referencia a las deformaciones de radios y traqueidas del xilema, como así también a la conformación de barreras anatómicas, también se vieron reflejados en los estudios con MEB (Fig. 38a,b).

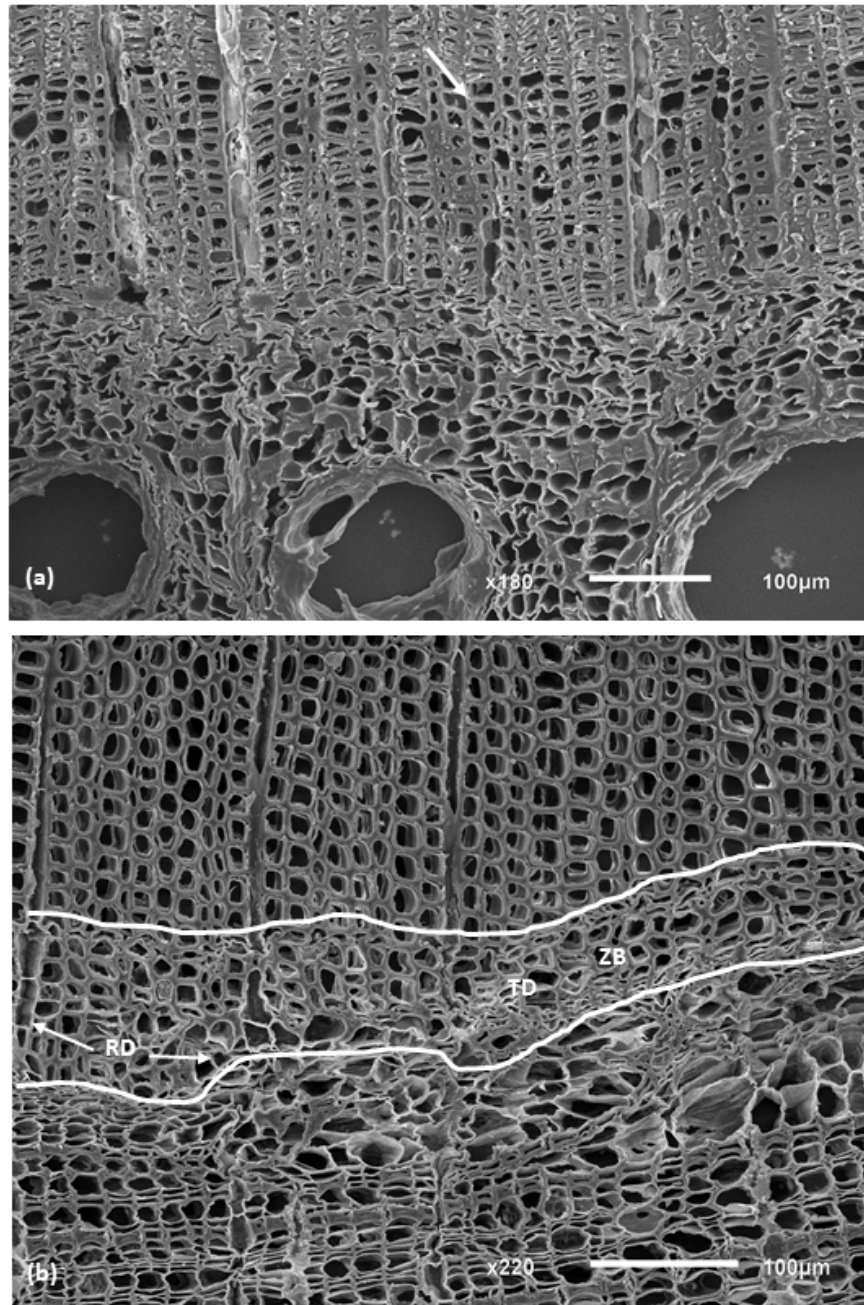
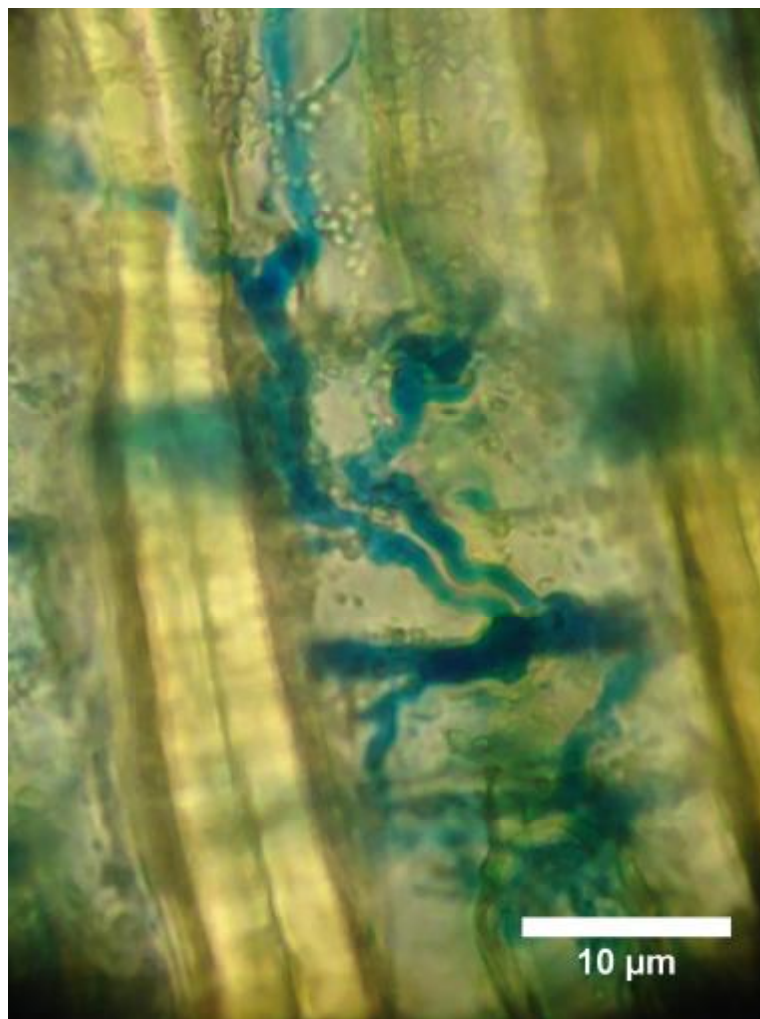


Figura 38. Sección transversal del tronco de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30 cm de diámetro infectado naturalmente, (a) y del tallo de planta de *A. chilensis* de 8 años inoculada artificialmente con *Phytophthora austrocedri*, (b) MEB mostrando deformaciones de radios y traqueidas en el xilema. **(a)** Zona de avance de la lesión, deformación y desordenamiento de las traqueidas del leño primavera verano del último año. **(b)** Detalle de la zona transición (entre la lesión y leño sano) en donde se observan las traqueidas y radios deformados (TD y RD) conformando una zona «tipo barrera» anatómica en el xilema. TD=traqueidas deformadas; RD=radios deformados; ZB=zona tipo barrera.

MECANISMO DE DESARROLLO DE *Phytophthora austrocedri* DENTRO DEL FLOEMA DE *Austrocedrus chilensis*



PRESENCIA DEL PATÓGENO EN EL FLOEMA

Mediante microscopía óptica se observó, en el floema de árboles adultos de ciprés de la cordillera infectados naturalmente, la presencia de hifas de *P. austrocedri* desarrollándose principalmente dentro de las células cribosas y del sistema parénquimático (Fig. 39). Dentro de éste último se observaron ramificaciones tanto hacia las células del parénquima axial (Fig. 39b) como a las del parénquima radial (Fig. 39c, Fig. 40a). Se observó que el desarrollo de las hifas en las células que componen los radios, se producen tanto en forma intra como intercelular. La colonización a través de este sistema de células, le permite alcanzar los radios parenquimáticos del xilema (Fig. 40b).

El desarrollo de las hifas dentro de las células cribosas, y especialmente del parénquima axial especialmente, estuvo acompañado de la presencia de abundantes cristales, que no fueron observados en el floema sano (Fig. 39a).

Se observó el desarrollo muy invasivo de las hifas de *P. austrocedri*, dentro de las células vivas del floema (cribosas), ocupando en algunos sectores casi la totalidad de dichas células conductoras (Fig. 40c,d).

También se observó el desarrollo de hifas dentro de las células del parénquima axial, que luego siguieron desarrollándose en los radios parenquimáticos. (Fig. 40b).

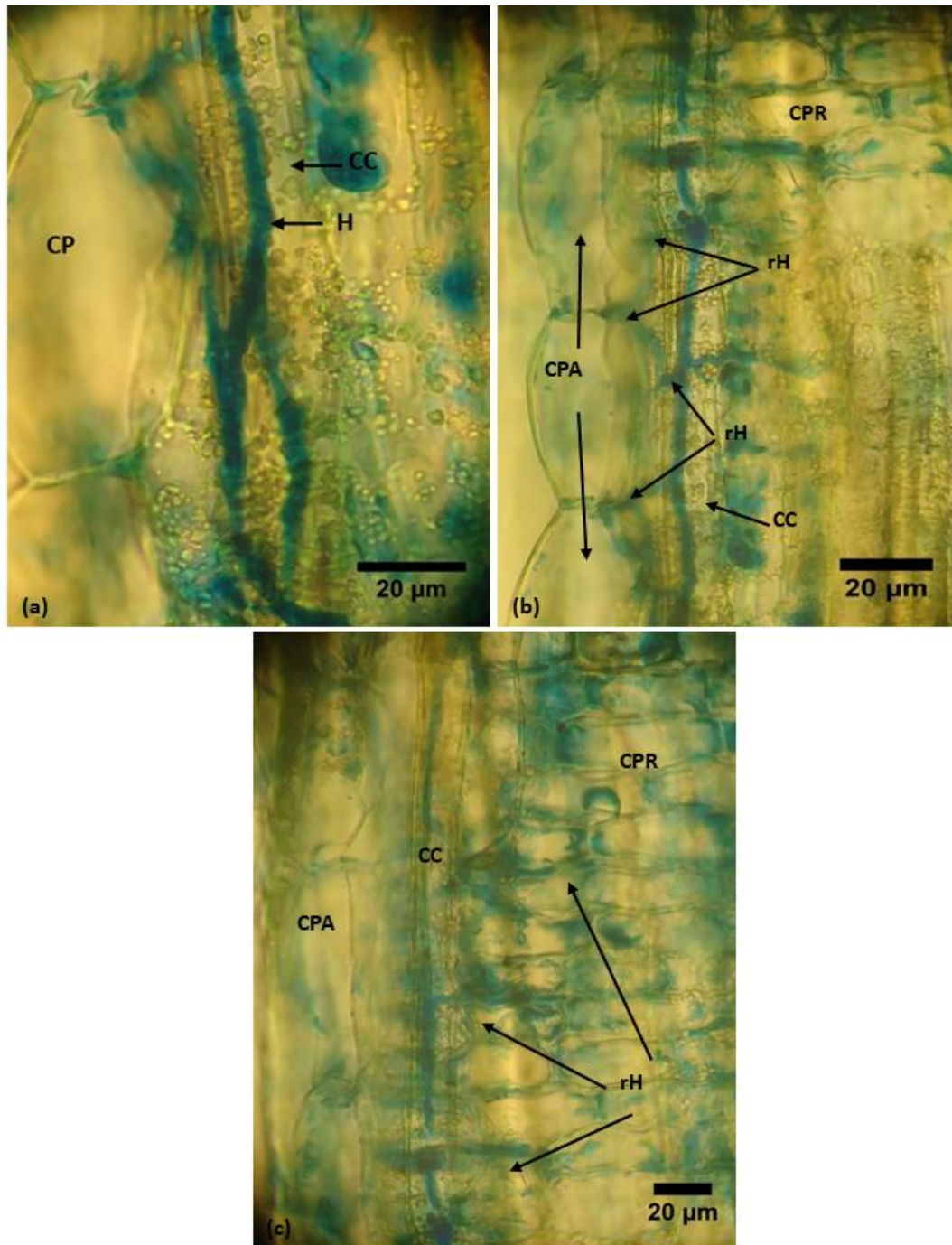


Figura 39. Sección longitudinal radial de floema de árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de algodón. Desarrollo de hifas en el floema. **(a)** Hifas (H) de *P. austrocedri* en sentido axial dentro de las células cribosas (CC) y presencia de cristales. **(b)** Ramificaciones de hifas desde células cribosas hacia células del parénquima axial. **(c)** Ramificaciones hacia el parénquima axial y radial. H=hifas; rH=ramificaciones hifales; CC=célula cribosa; CPA=célula del parénquima axial, CPR=células del parénquima radial.

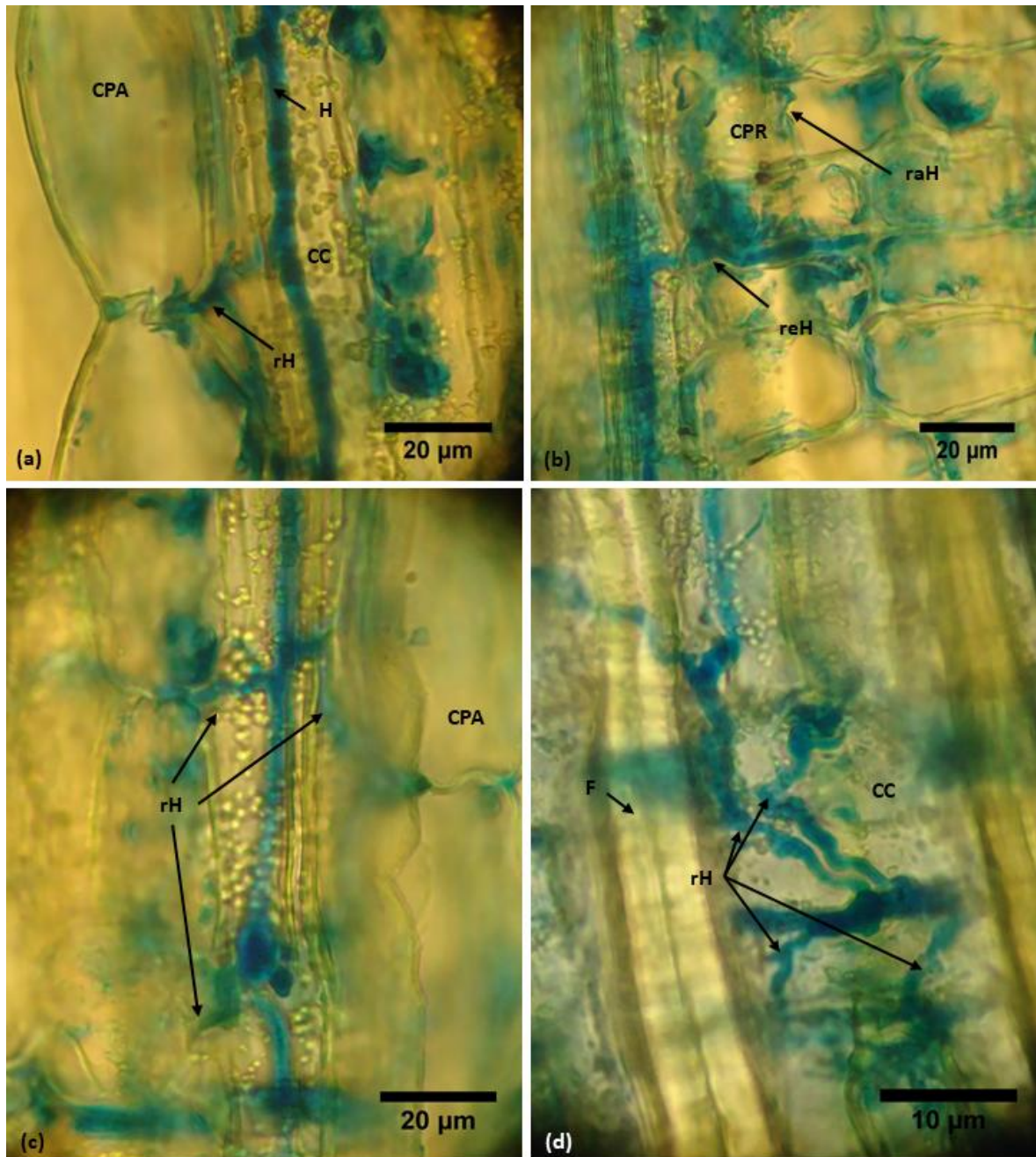


Figura 40. Sección longitudinal radial de floema de árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, tinción con azul de algodón, MO. Desarrollo de hifas en el floema. **(a)** Detalle de las ramificaciones hifales desde las células cribosas hacia las células del parénquima axial. **(b)** Ramificaciones y desarrollo intra e intercelularmente desde las células cribosas al parénquima radial de la hifas de *P. austrocedri*. **(c)** Inicio de las ramificaciones hifales desde las células cribosas y hacia células del sistema parenquimático axial. **(d)** Desarrollo de hifa y ramificaciones de *P. austrocedri* que ocupan y obturan la totalidad del lumen de las células cribosas. rH=ramificaciones hifales; CC=célula cribosa; CPA=célula del parénquima axial, CPR=célula del parénquima radial, F=fibra floemáticas, raH=ramificaciones intracelulares; reH=ramificaciones intercelulares.

Otro de los resultados importantes de esta etapa del trabajo fue haber encontrado y observado por primera vez las estructuras de reproducción sexual (oosporas) del patógeno en árboles infectados naturalmente. Dichas estructuras se observaron en los canales resiníferos del floema. (Fig. 41a-c). También se observó la presencia de grandes masas de hifas y resina, que producirían la obturación y taponamiento de los canales resiníferos (Fig. 41d,e).

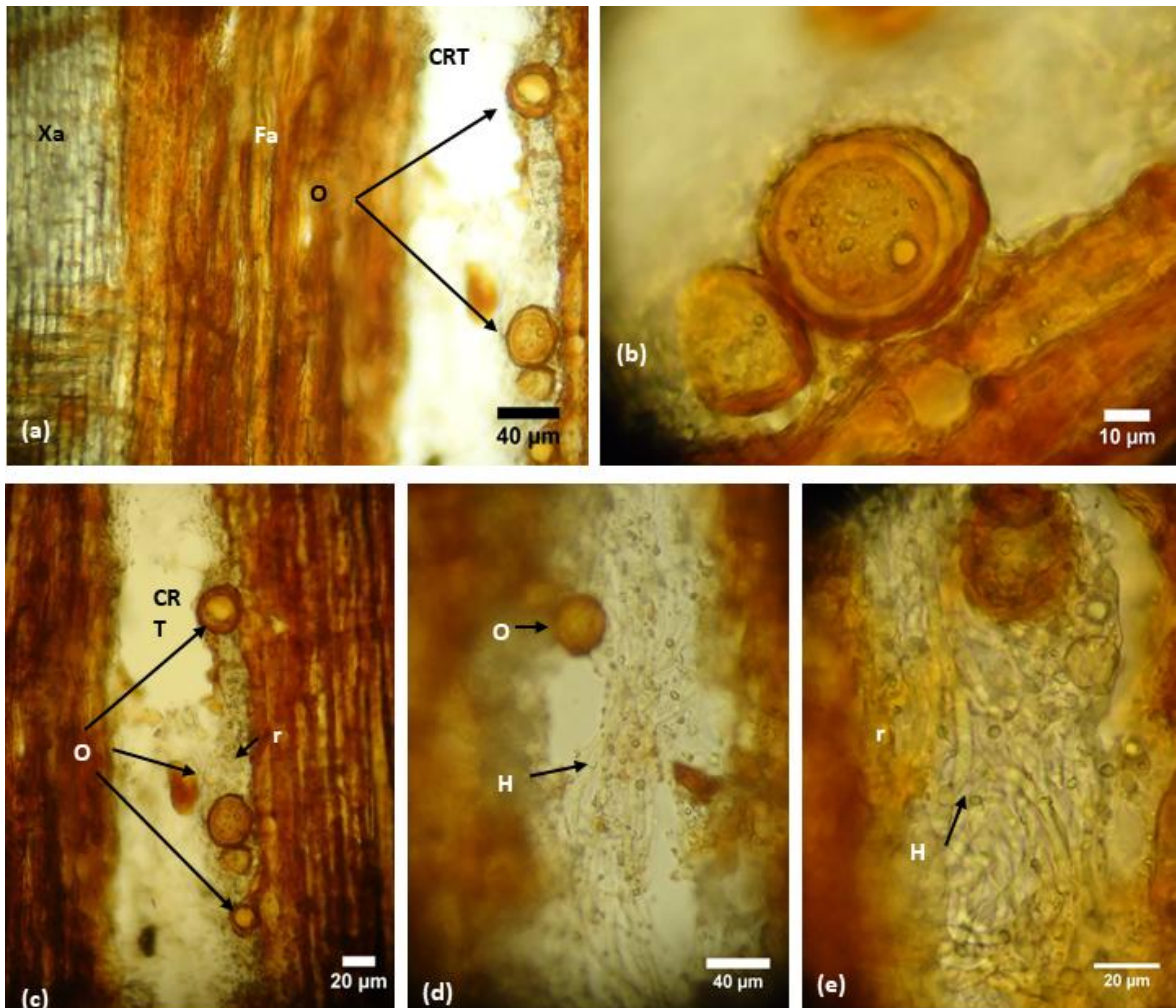


Figura 41. Sección longitudinal radial de floema de árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, (sin tinción) montaje en agua. Desarrollo de hifas y estructuras reproductivas de *P. austrocedri*. **(a)** Zona media de la lesión, observación de oosporas en los canales resiníferos traumáticos del floema. **(b)** Detalle de las oosporas en el canal resinífero, donde se puede ver su doble pared de quitina. **(c)** Observación de oosporas de *P. austrocedri* dentro de los canales resiníferos traumáticos del floema, adheridas a las paredes de dichos canales por la resina y distribuidos longitudinalmente dentro del mismo. **(d)** y **(e)** Detalle de de la masa de hifas desarrolladas dentro del canal resinífero traumático que produce junto con la resina, un proceso de obturación y taponamiento de dicho conducto. Xma= Xilema; Fa= Floema; CRT= canal resinífero traumático; O= Oospora; H= hifas; r= resina

Otras estructuras encontradas dentro de los canales resiníferos traumáticos fueron ensanchamientos hifales y clamidosporas (Fig. 42a,b)

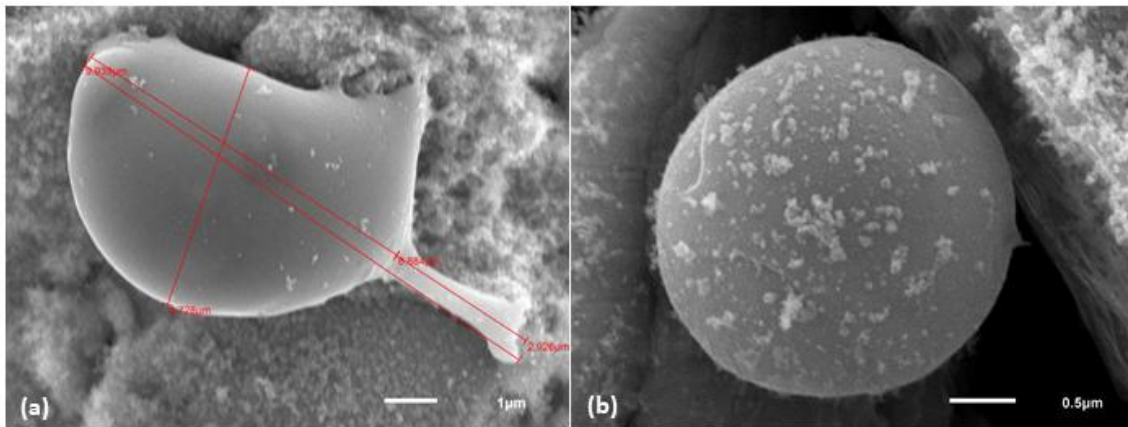


Figura 42. Sección longitudinal radial de floema de árboles adultos de *Austrocedrus chilensis* infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, MEB. Desarrollo de hifas y estructuras reproductivas de *P. austrocedri*. **(a)** Zona media de la lesión, presencia de ensanchamientos hifales y **(b)** clamidosporas dentro de los canales resiníferos traumáticos.

En MEB se observaron en detalle las hifas y las estructuras reproductivas de *P. austrocedri*, dentro del floema de árboles adultos infectados naturalmente. Se determinó con exactitud cómo es el desarrollo del patógeno dentro de este tejido de conducción. Se observó que en sentido axial utiliza principalmente dos elementos del floema a) las células cribosas y b) los canales resiníferos traumáticos. En las células cribosas se observó el desarrollo intracelular de hifas con sus ramificaciones que invadían y obturaban el lumen (Figura 43a,b). Se observó en detalle que, para colonizar las células del parénquima axial, las hifas atraviesan las áreas cribosas que comunican con el sistema parenquimático y desde allí se extienden hacia los radios (Fig. 44a,b).

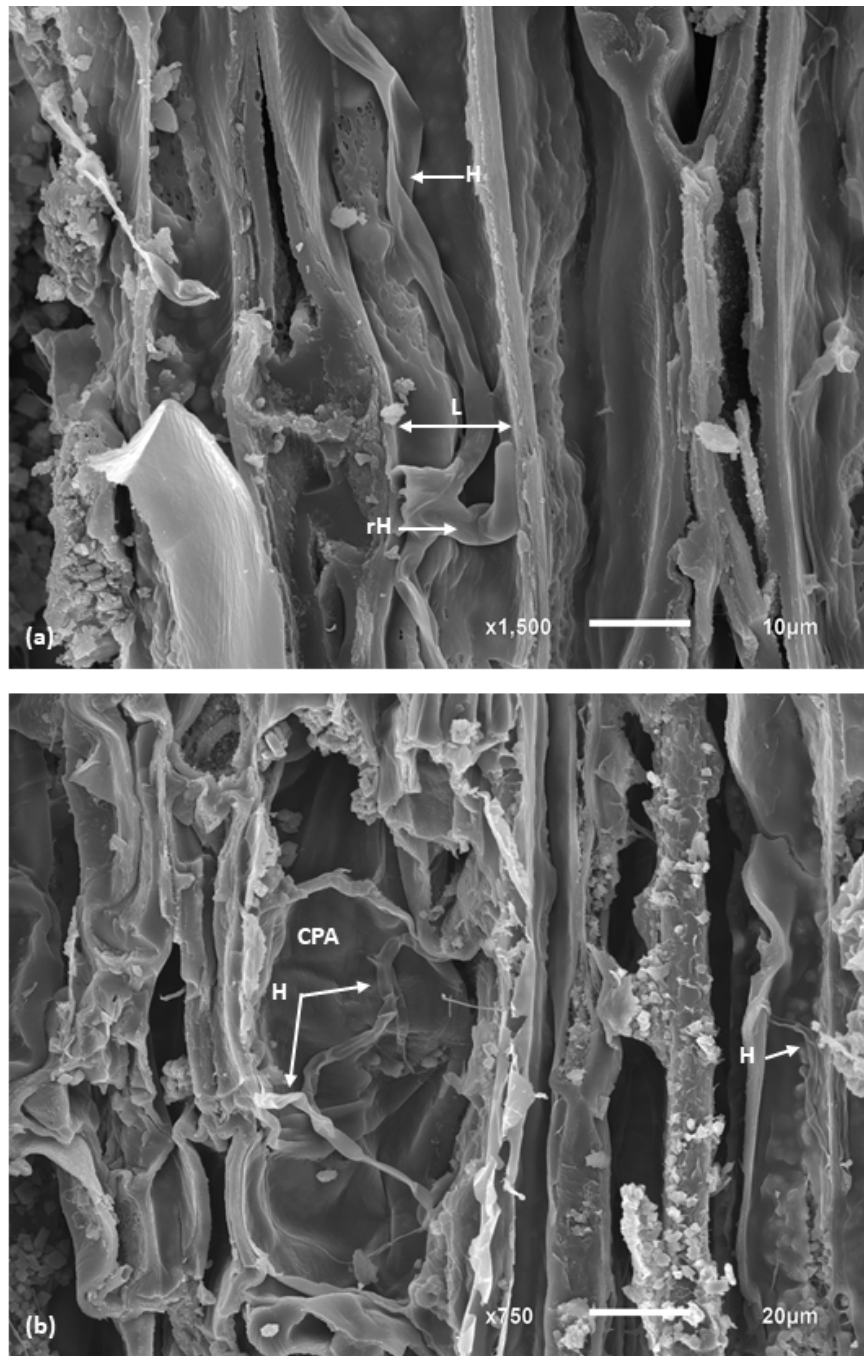


Figura 43. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 35cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Zona media de la lesión, desarrollo y ramificación de las hifas que producen obturación del lumen de la célula cribosa. **(b)** Detalle de la presencia de hifas y ramificaciones en célula del parénquima axial. L=lumen; H=hifa; rH=ramificaciones hifales; CPA=Células del parénquima axial.

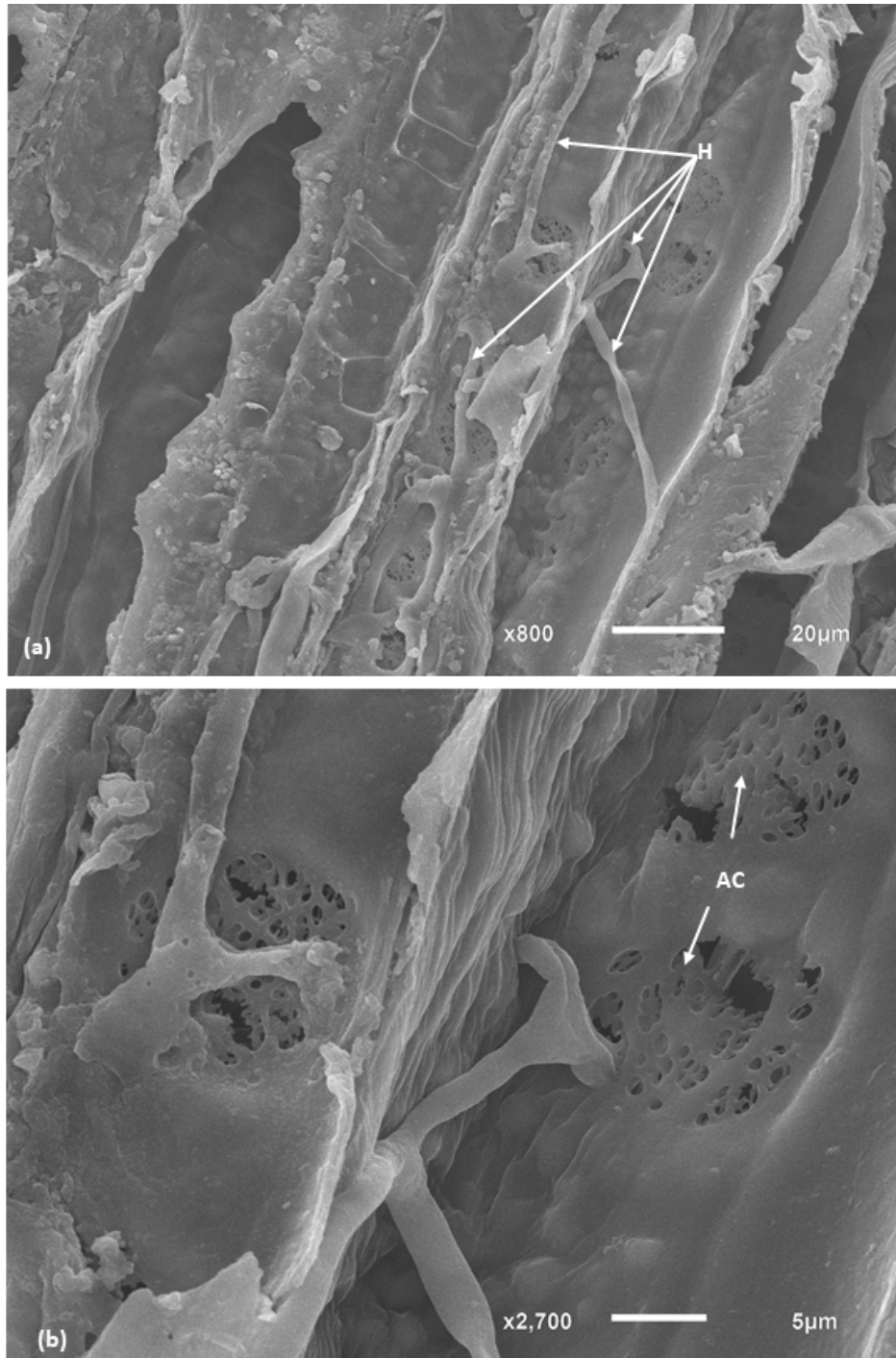


Figura 44. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Zona media de la lesión, desarrollo, ramificaciones y avance de *P. austrocedri* en sentido axial dentro de las células cribosas. **(b)** Detalle de las ramificaciones y el avance de hifas utilizando las áreas cribosas (AC) para pasar de una célula a otra. H=hifa; AC=área cribosa.

El otro elemento que utiliza *P. austrocedri* en sentido axial del floema, son los canales resiníferos traumáticos. Aquí se observó desarrollo de las hifas sobre las paredes de los canales (Figura 45a), como así también la evolución en el taponamiento por hifas de dichos canales, en las distintas zonas lesionadas del floema. (Fig 45b,c).

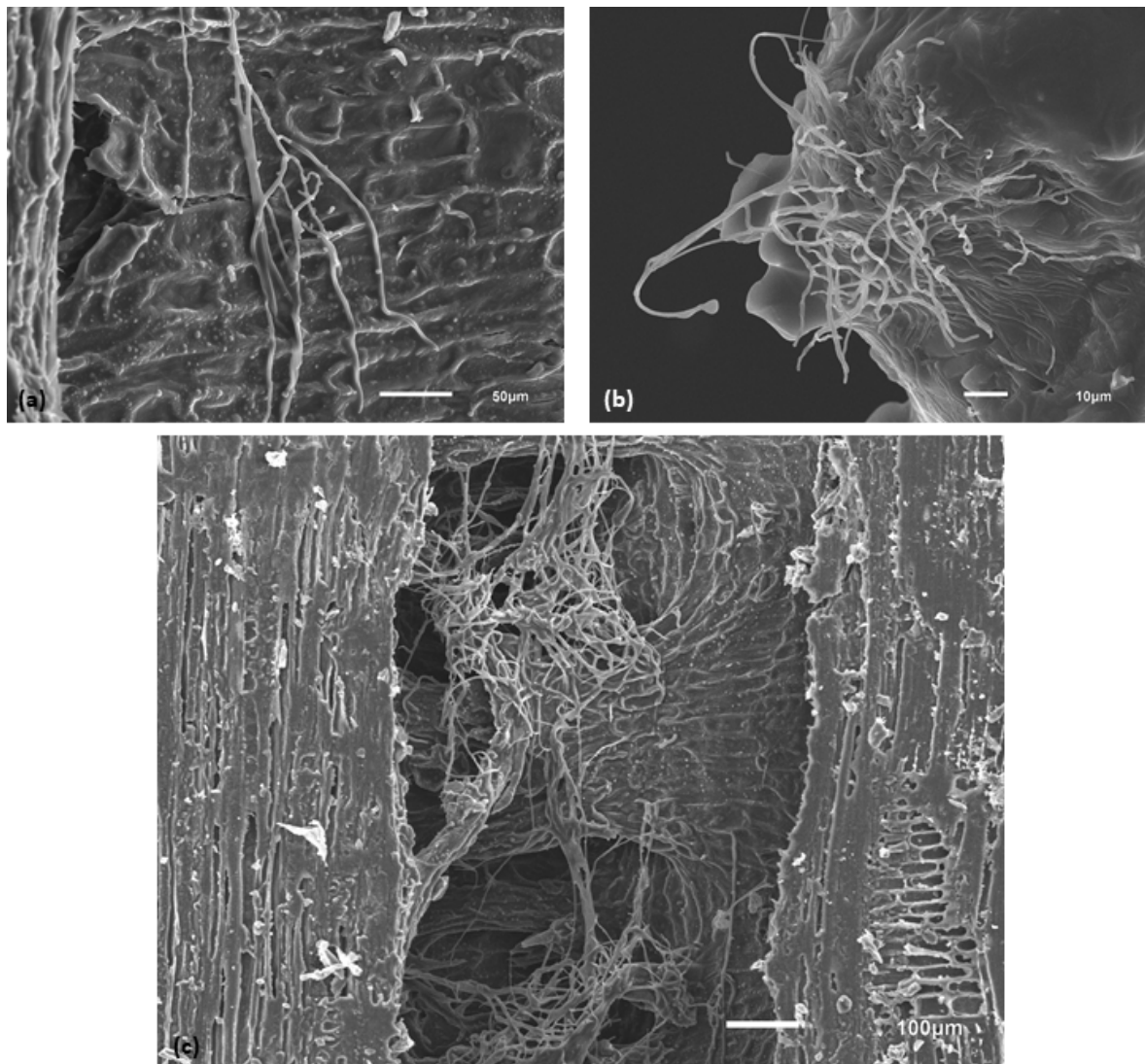


Figura 45. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Zona más antigua de la lesión, vista general del desarrollo y ramificación de hifas sobre las paredes epiteliales del canal resinífero. **(b)** Zona de avance de la lesión, detalle del desarrollo de hifas de *P. austrocedri* sobre resina de la pared del canal resinífero traumático. **(c)** Zona más antigua de la lesión, mostrando en detalle el desarrollo de las hifas dentro del canal resinífero traumático que se encuentran embebidas en resina obturando parcialmente el canal.

El detalle de las hifas de *P. austrocedri* inmersas en resina se muestra en la Fig 46a. Se observó que las hifas formaban “puentes hifales” que iban de pared a pared dentro de la cavidad del canal, los que se encontraban inmersos en resina, conformando verdaderas barreras de obturación de la circulación y taponamiento este elemento (Fig. 46b y 47).

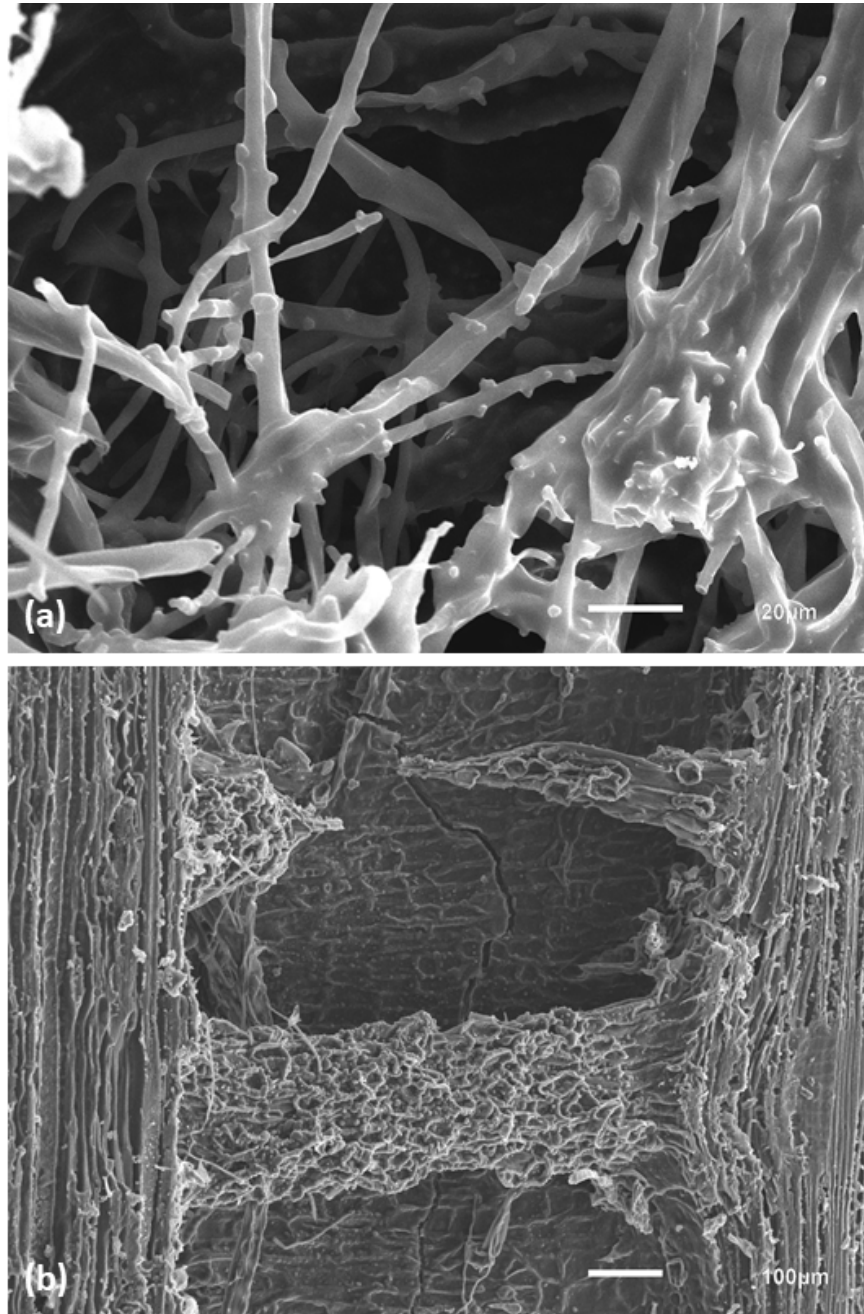


Figura 46. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Zona más antigua de la lesión dentro de canal resinífero traumático que muestra en detalle las hifas de *P. austrocedri* embebidas en resina. Obsérvese la forma típica con proyecciones laterales cortas. Esta situación da inicio a la conformación de una masa semiamorfa de hifas y resina dentro del canal. **(b)** Zona más antigua de la lesión, se observa la formación de «puentes» hifales transversales dentro de los canales resiníferos traumáticos. Estos puentes están conformados por una masa de hifas, estructuras reproductivas y resina.

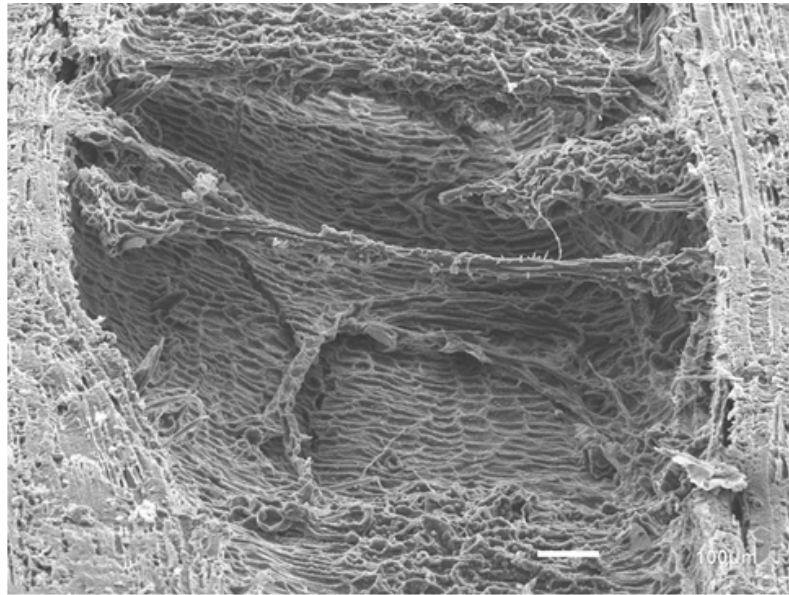


Figura 47. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a).** Vista general de la situación interna de los canales resiníferos y la formación de “puentes” hifales en la zona más antigua de la lesión.

Se pudo observar cómo las hifas se desarrollan sobre las paredes de los canales resiníferos (Fig.48a) y cómo atraviesan las paredes de los radios parenquimáticos desde esos canales (Fig. 48b), como así también la presencia de ensanchamientos hifales que se proyectaban desde las paredes hacia el interior de dichos canales. (Fig. 48c,d). Esto demostraría que el desarrollo y colonización que realiza *P. austrocedri* es en ambos sentidos (axial y radial) dentro del floema del ciprés de la cordillera; el axial es a través del parénquima axial, las células cribosas y los canales resiníferos, mientras que el radial es a través de los radios parenquimáticos.

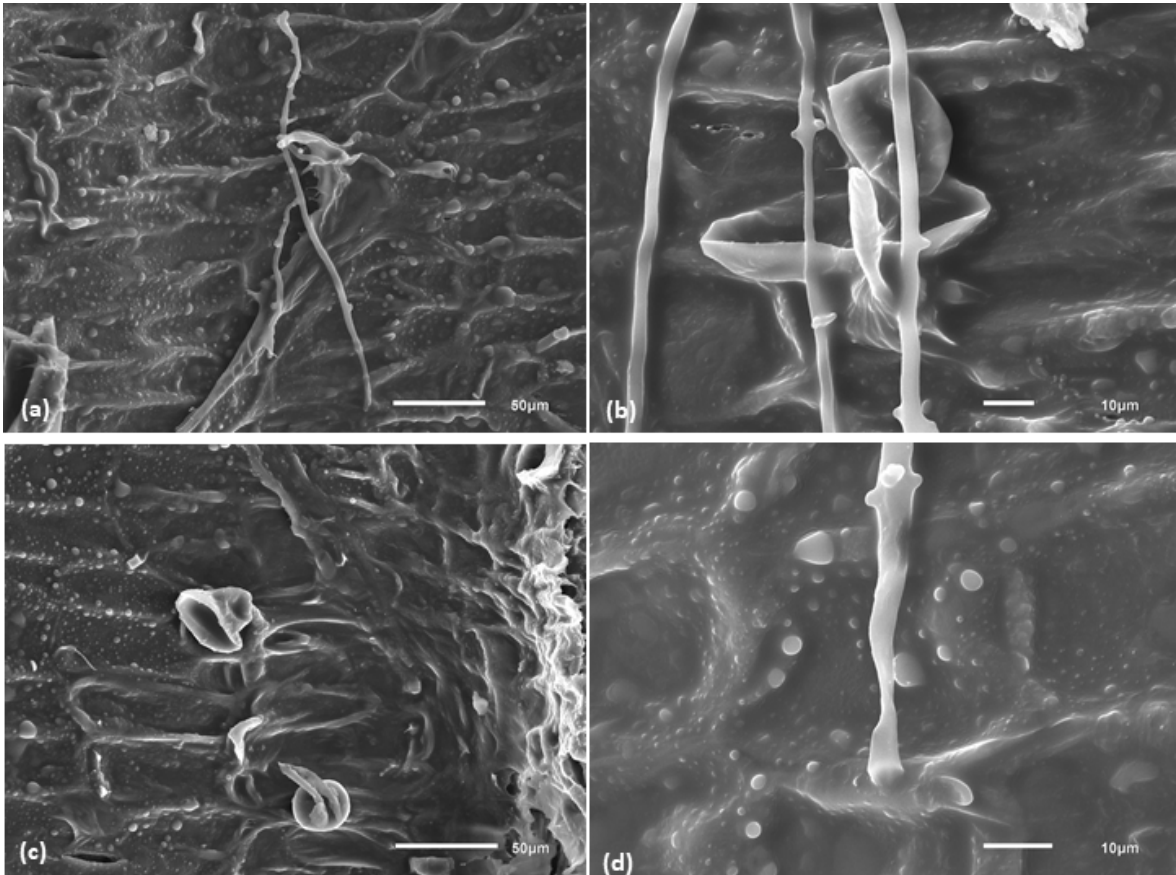
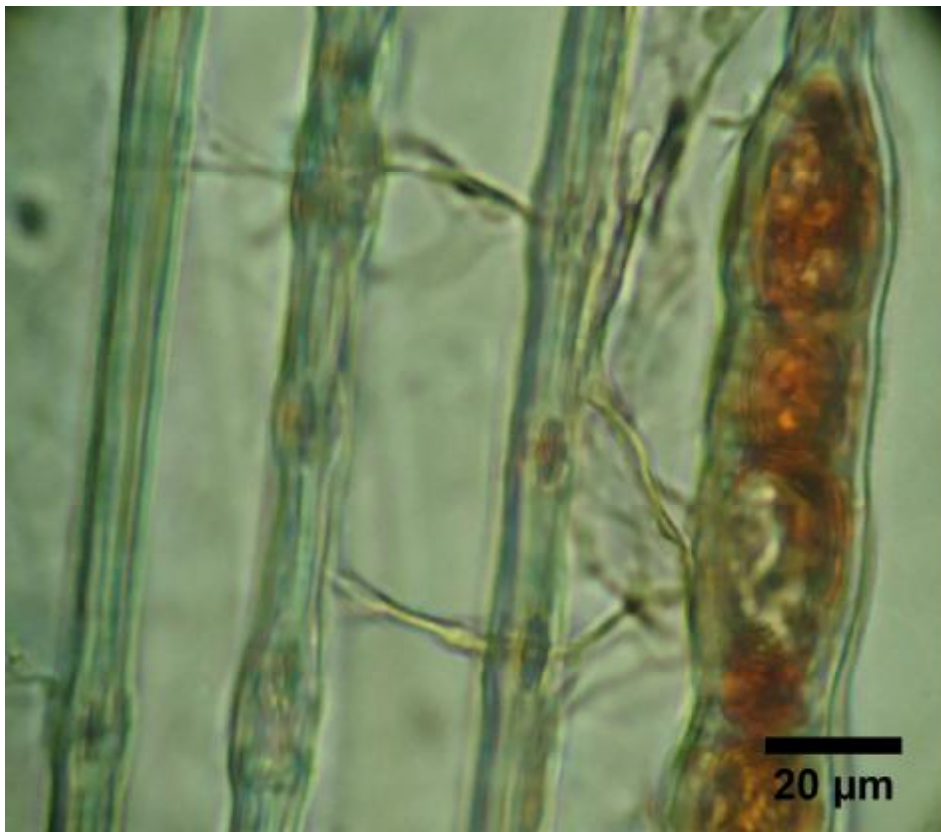


Figura 48. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Desarrollo de hifas sobre las paredes de los canales resiníferos traumáticos en la zona más antigua de la lesión. **(b)** Ensanchamientos hifales dentro del canal resinífero traumático. **(c)** y **(d)** Detalle de las hifas y de los ensanchamientos hifales que se producen sobre las células epiteliales del canal resinífero en la zona más antigua de la lesión.

MECANISMO DE DESARROLLO DE *Phytophthora austrocedri* EN EL XILEMA DE *Austrocedrus chilensis*



PRESENCIA DEL PATÓGENO EN EL XILEMA

La presencia del patógeno en los tejidos de árboles adultos infectados naturalmente pudo detectarse en microscopio óptico tanto con tinción en azul de algodón como con coloración combinada sucesiva doble safranina-*fast-green*. Se observaron hifas desarrollándose intracelularmente en el tejido xilemático tanto en los radios parenquimáticos como en las traqueidas (Fig. 49a,b).

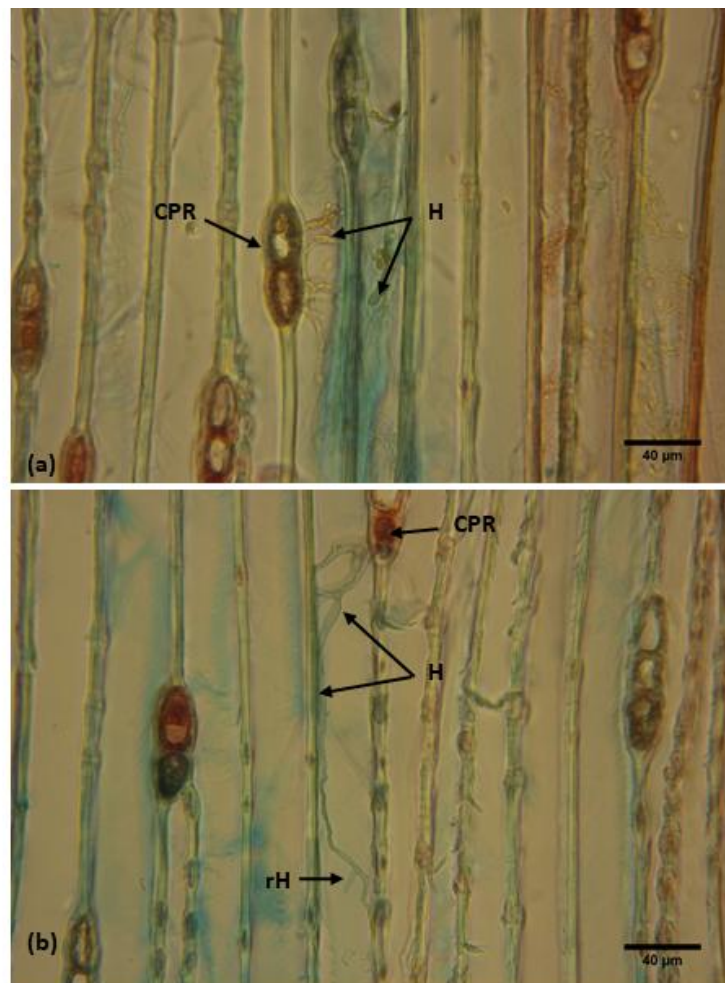


Figura 49. Sección longitudinal tangencial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido xilemático. **(a)** Ramificaciones de las hifas desde radios parenquimáticos hacia el lumen de las traqueidas. **(b)** Se observa la salida de las hifas desde las células del parénquima radial hacia el lumen de la traqueida en donde adquieren un gran desarrollo y comienzan a ramificarse. CPR=células del parénquima radial; H=hifa; rH=ramificaciones hifales.

En sentido radial, *P. austrocedri* se desarrolló en el xilema de ciprés de la cordillera por los radios parenquimáticos. Se observó que las hifas pasan a las traqueidas a través de las puntuaciones de los radios parenquimáticos y una vez

allí, se ramifican y ocupan el lumen de éstas células del xilema, obturando gran parte del mismo (Fig. 50a,b,c).

Este desarrollo de la hifas dentro de las traqueidas, permite un desplazamiento de *P. austrocedri* en sentido axial y del flujo de agua; lo que permitiría llegar a otras partes del leño. El avance de las hifas de *P.austrocedri* entre traqueidas y hacia otras zonas del xilema, ocurre a través de la puntuaciones areoladas (Fig. 50b). Se observó que cuando los avances de *P. austrocedri* dentro del leño de ciprés, se realizan entre pares de puntuaciones opuestas, se configuran “puentes hifales” dentro de la traqueida. Esta situación se vio repetidamente, lo que contribuiría también a una disminución en la circulación en el tejido xilemático (Fig. 51).

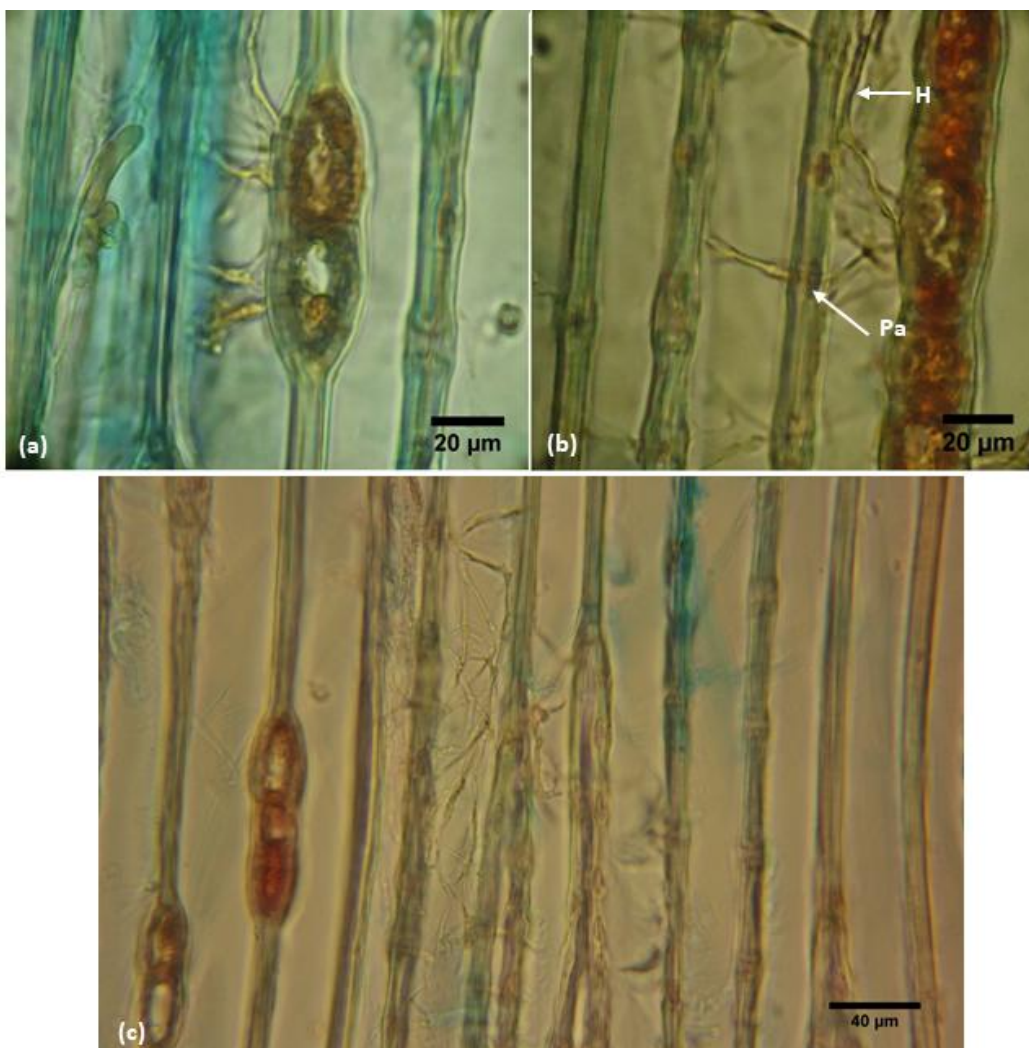


Figura 50. Sección longitudinal tangencial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido xilemático. **(a)** Zona media de la lesión, se observa la salida de las hifas desde los radios parenquimáticos hacia las traqueidas. **(b)** Detalle de las hifas (H) dentro del lumen de las traqueidas y el desarrollo lateral que realizan a través de las punteaduras areoladas (Pa). **(c)** Desarrollo de hifas dentro de los lúmenes de las traqueidas, obturando casi la totalidad de los mismos. H=hifas; Pa=punteadura areolada.

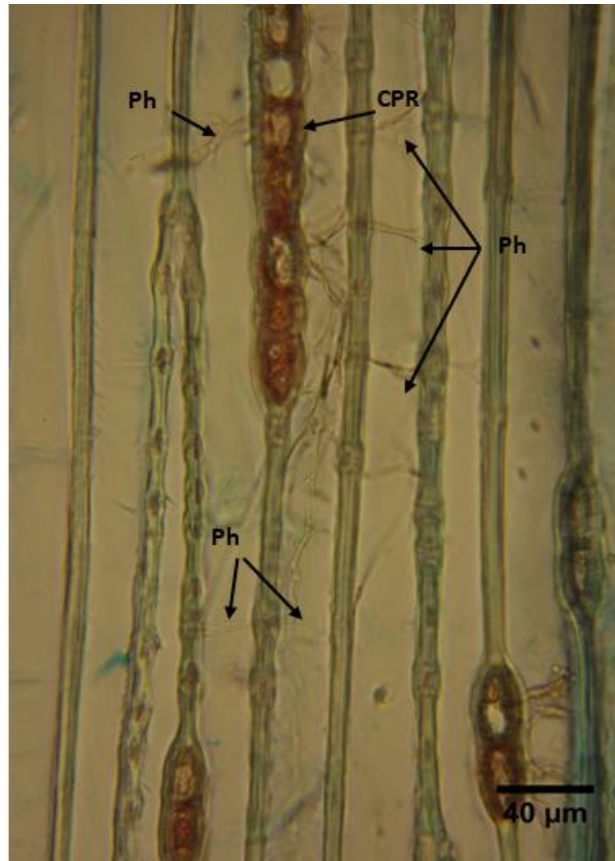


Figura 51. Sección longitudinal tangencial del leño de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido xilemático. Zona media de la lesión, donde se observa que el avance de las hifas a través de punteaduras opuestas, conforman “puente hifales” (Ph) que cortan transversalmente el lumen de las traqueidas. Estas formaciones se pueden observar también de las hifas que salen desde los radios parenquimáticos y se conectan con las punteaduras de las traqueidas. CPR=células del parénquima radial, Pi= “puentes hifales”.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Con las técnicas utilizadas en microscopía electrónica de barrido (MEB) para muestras de xilema, se pudo constatar el mecanismo de colonización del patógeno dentro de este tejido de conducción. El desarrollo de las hifas de *P. austrocedri* dentro de las traqueidas que conforman el tejido xilemático, fue sobre la pared celular y se pudo observar que atravesaron el margo que rodea al torus de la membrana de las puntuaciones areoladas. (Fig. 52a,b). Dado que este margo está compuesto sólo por fibrillas dispuestas radialmente, se ve facilitado el pasaje de las hifas.

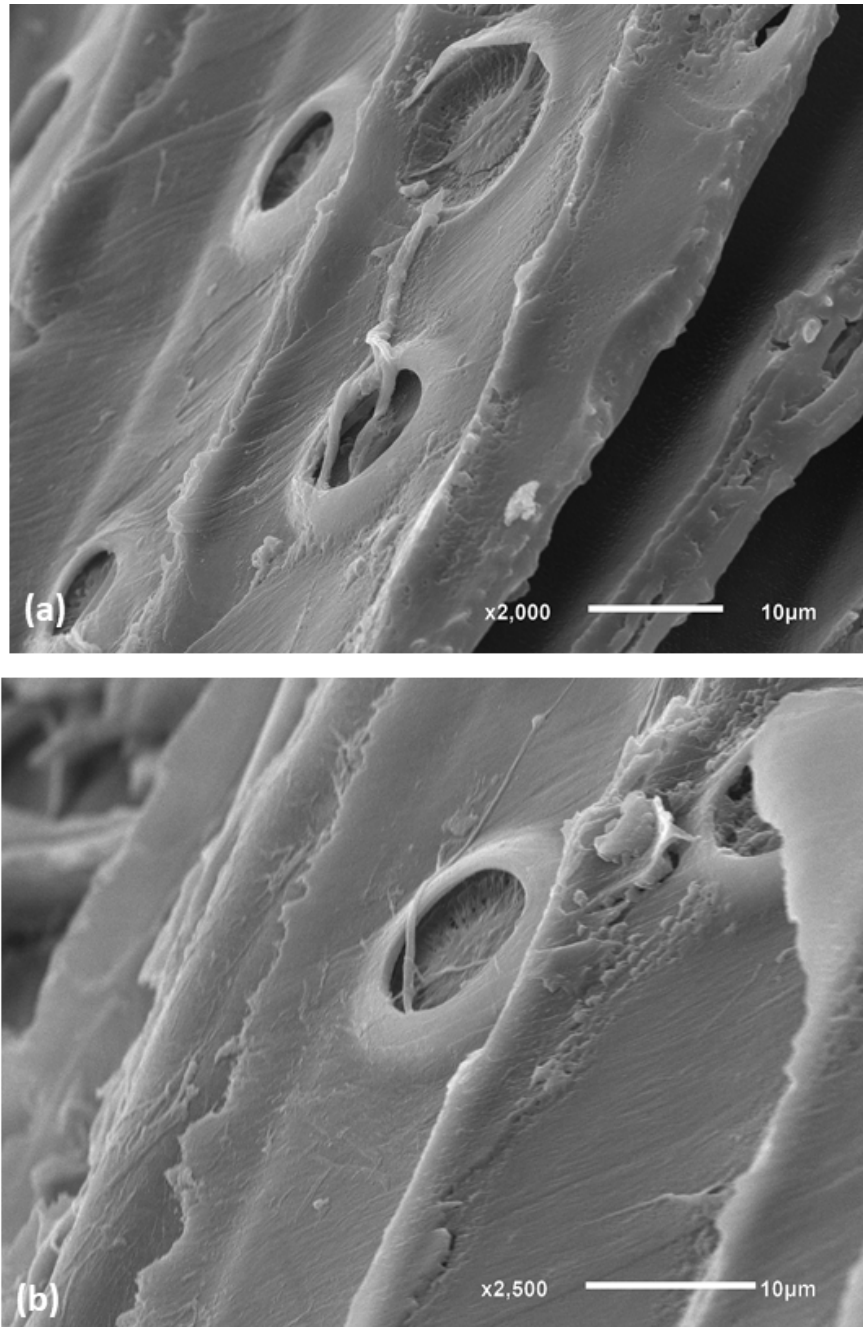


Figura 52. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** y **(b)** Zona más antigua de la lesión donde se observa el desarrollo y paso de las hifas de *P. austrocedri* a través del margo de las puntuaciones areoladas de las traqueidas.

Por otra parte, en árboles jóvenes infectados artificialmente se observó el avance en sentido radial desde la albura hacia la médula. El mismo se realizó a través de los radios xilemáticos, en los cuales *P. austrocedri* también coloniza y obstruye el sistema de circulación radial del ciprés (Fig. 53a,b,c)

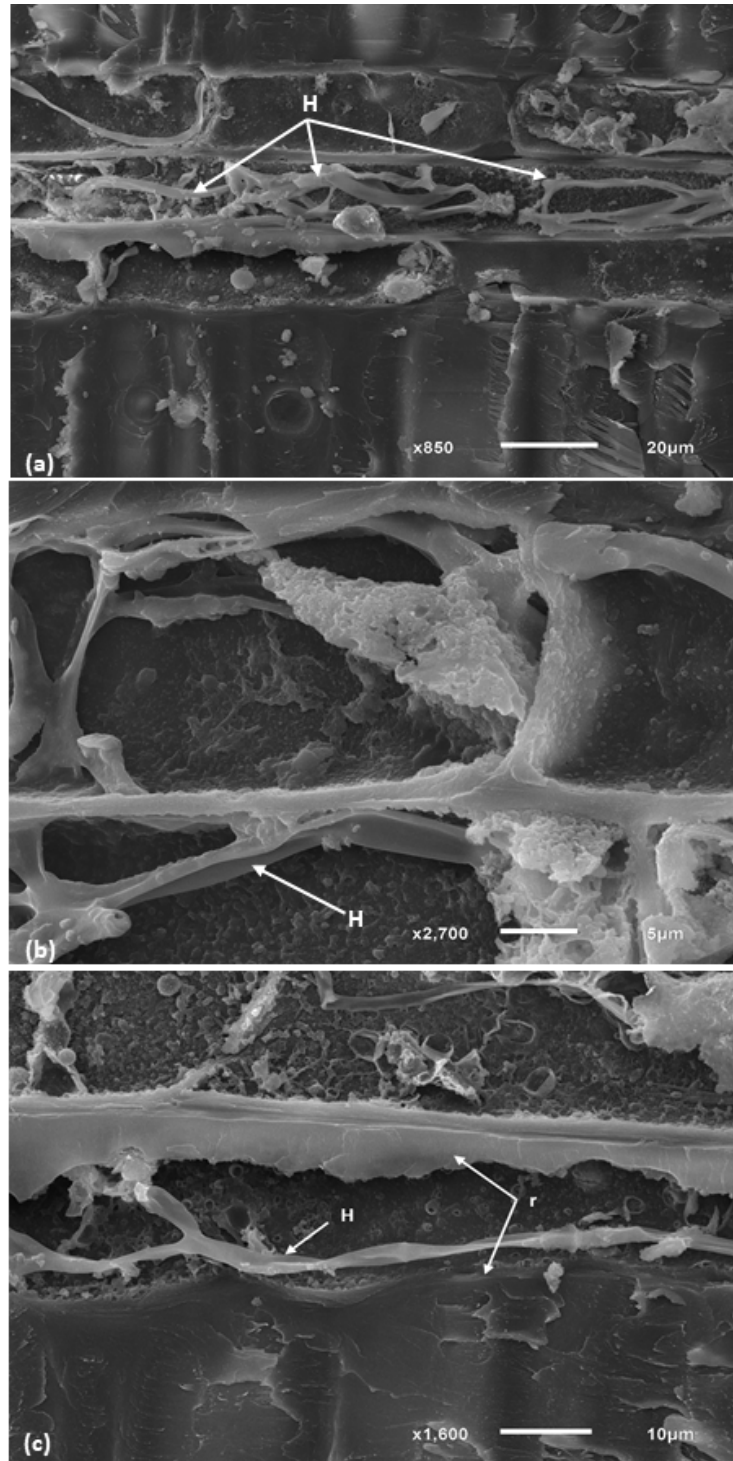


Figura 53. Sección longitudinal radial del leño de plantas jóvenes de *Austrocedrus chilensis* de 8 años inoculadas artificialmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB . Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido xilemático. **(a)** Zona de avance de la lesión donde se observa el desarrollo e sentido radial de la hifas (H) de *P. austrocedri* a través de los radios parenquimáticos. **(b)** Detalle de hifa (H) en el radio parenquimático. **(c)** Detalle de hifa de *P. austrocedri* en radio parenquimático que presenta acumulación de resinas sobre las paredes celulares. r=resina

Las otras estructuras de *P. austrocedri* encontradas en el xilema de ciprés fueron clamidosporas. Las mismas se observaron dentro del lumen de las traqueidas, y fueron registradas en sección transversal y en sección longitudinal radial. Se observó cómo cada una de estas estructuras ocupaba la totalidad del lumen de la traqueida, obstruyendo la normal circulación dentro de este tejido (Fig. 54a,b).

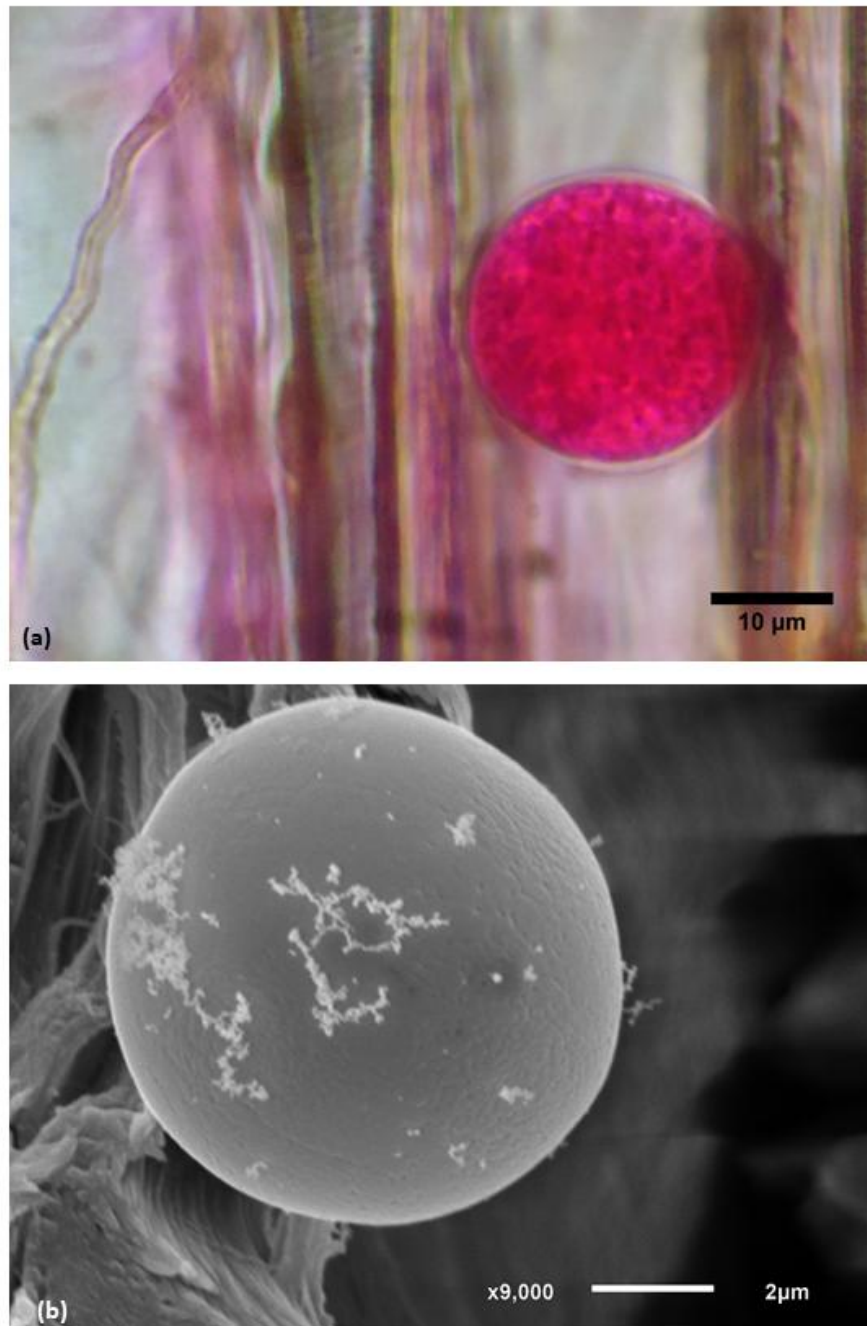


Figura 54. Sección longitudinal radial del leño de árbol de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, (a) tinción con safranina microscopia de campo claro, (b) sección transversal MEB . **(a)** Presencia de clamidospora obstruyendo el lumen de la traqueida, se observa en la traqueida adyacente la presencia de hifas. **(b)** Detalle de clamidospora en zona más antigua de la lesión.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo demostró que *P. austrocedri* produce una necrosis del cambium vascular, siendo éste el primer tejido afectado luego del ingreso del patógeno a la planta. Posteriormente es afectado el floema y por último el xilema. Otras especies de *Phytophthora*, que causan lesiones en tallo o canchros de tronco en los árboles, también inician su ataque en la sección del cambium y afectan luego a los tejidos vecinos (floema y xilema), principalmente al floema causando el colapso de sus células (Pogoda et al. 2004; Nagle et al. 2011).

Todas las situaciones analizadas de la enfermedad en los tejidos de conducción del tallo (zona de avance, zona media y zona de inoculación y/o más antigua de la lesión), tanto en ejemplares adultos como en ejemplares jóvenes, permiten afirmar que el primer tejido leñoso afectado por *P. austrocedri* es el cambium vascular, observándose primero una pérdida de turgencia de sus células y luego, a medida que avanza la lesión, esto se manifiesta con sus células totalmente colapsadas y necrosadas.

Aparentemente, como consecuencia del ataque de *P. austrocedri* y respuesta al mismo, el cambium vascular realiza una reprogramación de las células madres tanto del floema como del xilema. La reprogramación de las células madres del floema resulta en la conformación de canales resiníferos traumáticos, bolsones de resina y una deformación y desordenamiento de sus elementos celulares.

Una respuesta de defensa importante de las coníferas a los ataques de insectos y hongos es la producción y movilización de resina (Berryman, 1972; Raffa y Berryman, 1983). Los efectos defensivos de la resina de coníferas se atribuyen a sus propiedades tóxicas y pegajosas, al flujo de resina masiva que puede expulsar o repeler la invasión de insectos, y a los efectos inhibitorios sobre hongos patógenos (Reid et al. 1967; Shrimpton y Whitney, 1968; Bordsch y Berryman, 1977; Gijzen et al. 1993).

Investigaciones recientes indican que la producción de canales resiníferos traumáticos es una respuesta de defensa, la cual es inducida por el Metil Jasmonato a través de la producción de etileno, que provoca la reprogramación de la zona cambial para la formación de conductos traumáticos (Hudgins y

Franceschi, 2004; Hudgins et al. 2004). Por lo general, la formación de los canales resiníferos traumáticos es inducida por daños mecánicos o por el ataque y/o alimentación de insectos, otros artrópodos, y patógenos, se forman por encima y por debajo del sitio dañado en el tallo, formando conductos axiales de resina (Ito, 1998; Nagy et al. 2000; Hudgins y Franceschi, 2004; Hudgins et al. 2004; Krekling et al. 2004; Hudgins et al. 2005; Franceschi et al. 2005; Cruickshank et al. 2006). Estos conductos están interconectados con los conductos de resina radiales del floema (Nagy et al. 2000). Algunas especies de coníferas forman conductos traumáticos por inducción en el floema en lugar del xilema (Hudgins et al. 2004).

El resultado final del desarrollo de conductos de resina traumática es incrementar la formación y acumulación de resina (Martin et al. 2002; Miller et al. 2005) y reforzar el flujo de resina actual. El aumento del flujo de resina puede ayudar a matar o ahuyentar a los invasores, así como sellar la herida y evitar otros ataques; empapando con resina otras zonas del árbol.

El sistema de conductos de resina traumática maduro, forma una red que abarca el contacto directo entre las células epiteliales del conducto traumático y las células del parénquima de los radios, así como la continuidad del lumen entre conductos adyacentes traumáticos y los conductos de resina radiales. De esta manera, los dos sistemas de conductos se complementan entre sí porque atraviesan el tronco tanto en dirección axial como radial (xilema-floema). Estas redes ofrecen una protección más elaborada que la que existiría si el sistema de resina inducida estuviera restringido exclusivamente al plano axial, y facilitan el flujo de resina hacia otros sectores (Nagy et al. 2000)

Los conductos de resina traumática probablemente tienen un efecto positivo en la resistencia de los árboles al añadir más volumen de resina que el almacenado habitualmente (Christiansen et al. 1999). Hay evidencia de que los conductos traumáticos pueden impartir resistencia adquirida a un posterior ataque (Christiansen et al. 1999; Krokene et al. 2003; Franceschi et al. 2005) y que la resina en los conductos traumáticos puede ser más tóxica a través de cambios en los componentes de terpenoides o la adición de compuestos fenólicos teniendo mayor relevancia para la capacidad defensiva (Nagy et al. 2000). Las resinas de ciprés de la cordillera infectados con *P. austrocedri* muestran diferencias en sus perfiles de diterpenos en comparación con las resinas de árboles sanos y,

además, evidenciaron un efecto fungistático, inhibiendo el crecimiento micelial *in vitro* (Otale et al. 2015). La exudación de resina en ciprés de la cordillera se ha asociado con lesiones de *Phytophthora* (Greslebin y Hansen 2010). El flujo de la resina emerge generalmente de un bolsón de resina en el floema, ubicado cerca del margen de una lesión necrótica. Las bolsas de resinas observadas microscópicamente, serían las responsables de la sintomatología diagnóstica externa sobre la corteza de los árboles en pie (exudados de resinas), vulgarmente conocidas como “chorreaduras de resina”.

Por otra parte, existen varios antecedentes que describen la formación de conductos de resina traumática en el floema de las especies pertenecientes a la familia Cupressaceae (Yamanaka 1989; Kuroda 1998; Yamada et al. 2002, 2003, Cleary et al. 2011); sin embargo, este es el primer trabajo que documenta la anatomía y formación de canales resiníferos traumáticos y bolsones de resina en el floema de ciprés de la cordillera, los cuales formarían parte del sistema de defensa inducido que posee esta especie en respuesta al ataque de *P. austrocedri*.

La deformación y el desordenamiento de los elementos del floema generada por la reprogramación del cambium se observó en la zona de transición entre la zona sana y afectada, donde conformó una “zona tipo barrera anatómica”, que separaba los tejidos afectados de los sanos. Los tejidos afectados se evidencian por un angostamiento de la zona, y necrosis y colapso de sus células.

Franceschi, et al. (1998), en los estudios sobre la anatomía de la corteza y del floema de *Picea abies* susceptibles a *Ceratocystis polonica*, describen una desorganización celular de la zona afectada, causada por la aparición de una amplia zona de células anormales que contienen sustancias fenólicas, que se extiende desde el floema secundario, a través del cambium, hasta el xilema.

Fink (1986), en sus investigaciones histológicas sobre los tejidos de conducción de *Picea* spp. y *Abies* spp., halló cambios anatómicos específicos en el floema secundario de árboles enfermos. En esas especies, varias células del parénquima floemático se agrandan y se disuelven las paredes entre células adyacentes. Estas últimas se fusionan, y de este modo se forman grandes células hacia el floema no funcional (malformaciones en los elementos del floema). Esto constituye una reacción patológica en los árboles enfermos, dado que la misma no se observa en el floema secundario normal. Los resultados observados en

ciprés con respecto al tipo de necrosis y malformaciones en este tejido, coinciden en gran parte con los estudios de histopatología de la infección y colonización de *Phytophthora lateralis* en el ciprés de lawson (Oh y Hansen, 2007), en el cual las células en el cambium y el floema también se colapsan o desorganizan aun cuando no se observen hifas en los tejidos.

Las investigaciones de Greslebin y Hansen (2010) indican que el principal signo de *P. austrocedri* en los árboles naturalmente infectados es la lesión necrótica, que se extiende desde las raíces muertas hasta 1 m del tronco del árbol. Esta lesión afecta todo el espesor del floema y también, al menos superficialmente, a la albura que se presenta coloreada. Los estudios anatómicos del floema y del cambium vascular hasta aquí realizados confirman y coinciden con los resultados de estas investigaciones sobre la necrosis de dichos tejidos vasculares.

La reprogramación del cambium hacia el xilema da como respuesta, la conformación de una barrera anatómica por la deformación de radios y traqueidas en el último anillo de crecimiento y la formación de trabéculas.

En los estudios sobre la anatomía de la corteza y del floema de *Picea abies* susceptibles a *Ceratocystis polonica*, Franceschi et al. (1998) describen una desorganización celular de la zona afectada, la cual se extiende hasta el xilema, con la malformación de radios y traqueidas. Existen antecedentes también sobre la presencia de traqueidas llenas de resinas usualmente asociadas al parénquima radial y no con los conductos normales de resina en *Pinus radiata* afectado por *P. cinnamomi* (Davison et al. 1994). Según Tippet y Shigo (1981), la formación de zonas de barrera como mecanismos de defensa contra patógenos vasculares, pueden ser importantes para restringir la difusión pasiva de toxinas fúngicas, o metabolitos fitotóxicos producidos por reacciones necróticas del patógeno.

La desorganización celular observada en el leño de ciprés, podría constituir una estructura de defensa anatómica del tipo “zona de barrera” para aislar el xilema del tejido lesionado (cambium y floema). En el leño de ciprés afectado por *P. austrocedri*, la zona de barrera, por las características descritas anteriormente, podría no solo constituir un mecanismo de defensa, sino que contribuiría a la disminución de la conductibilidad hidráulica del xilema, debido a las obturaciones de la traqueidas de los últimos años. Los trabajos de Vélez et al. (2012) con plantas jóvenes de ciprés de la cordillera inoculadas artificialmente con *P.*

austrocedri, muestran el bloqueo del transporte del xilema producido por la colonización hifal, la presencia de tapones resinosos y la muerte del parénquima xilemático radial, lo cual lleva a una pérdida de conductividad hidráulica y de la capacidad del suministro de agua.

Las trabéculas observadas en el leño de ciprés de la cordillera estarían asociadas notablemente al ataque de *P. austrocedri*, dado que en el 100% de las muestras infectadas se observaron trabéculas, mientras que en los árboles sanos estudiados no se encontró este tipo de estructura anatómica,.

Algunos autores han indicado que las trabéculas ocurren normalmente en ciertas plantas leñosas y herbáceas (Mameli, 1913; Bärner, 1937); mientras que otros sugieren que las trabéculas se producen como resultado de una lesión (Werker y Baas, 1981). Los tipos de lesión al cambium sugeridos en la literatura como causas para la formación de trabéculas son: virus, como en algunas variedades de *Vitis vinifera* (Schneiders, 1937, 1958, Wehrmeyer, 1960, Hoefert Gifford, 1967, literatura resumida por Von Müller-Stoll, 1965), picaduras de áfidos (Bode, 1938 citado por Müller-Stoll, 1965), efectos del frío (Von Müller-Stoll, 1965), otros factores climáticos no especificados (Raatz, 1892), y hongos, donde se cree que las trabéculas se originan en el cambium donde el material celular se deposita alrededor de un filamento fino que supuestamente atraviesa la célula viva (Hale, 1923).

La investigación de Hoefert y Gifford (1967) ha demostrado la presencia de trabéculas únicamente en los tallos de vid infectados con el “virus de la hoja enrollada de vid”. Según este autor, las trabéculas pueden ser estructuras anormales inducidas por el virus dentro de las células del hospedante, presumiblemente como un efecto secundario de la enfermedad.

Jeffrey (1917) y Hale (1935) han señalado la infección por hongos como causa directa o indirecta de la formación de trabéculas. Aunque la teoría fúngica se ha introducido en casi todos los libros de texto estándar, hasta el momento los casos son difíciles de explicar. Podría ser posible que la proliferación de trabéculas sea estimulada por algún tipo de agente secretado por parásitos fúngicos o producido a través de una complicada interacción huésped-parásito (Yumoto, 1984). Según Grosser (1984), la función de la trabécula es prevenir un colapso de las paredes celulares tangenciales durante la compresión local o tensión de tracción,

interponiéndose como elementos de refuerzo entre paredes. La trabécula y sus estructuras relacionadas se consideran como un tipo de estructura anormal que se forma por procesos biológicos mal controlados (Yumoto, 1984).

La conformación de las trabéculas como barreras mecánicas dentro del lumen del xilema conductor, podría estar disminuyendo el caudal hidráulico y, de esta manera, fomentando el debilitamiento del árbol. La disminución de la conductividad hidráulica específica en plantas de ciprés infectadas con *P. austrocedri* ha sido documentada por Vélez et al. (2012). La gran cantidad de trabéculas halladas en los árboles adultos infectados naturalmente es indicio de una asociación entre la formación de trabéculas y el ataque de *P. austrocedri*. Esto a su vez contribuiría, junto con otros factores como la muerte de las raicillas, a disminuir la conducción de agua y, consecuentemente, produciría el marchitamiento y defoliación que es una de los principales síntomas externos del mal del ciprés (Greslebin et al. 2010).

Si bien los estudios de Roig (1992) y García et al. (2004) citan la presencia de trabéculas como elemento no excluyente y/o excepcionalmente presente en el leño de ciprés, los estudios de Guerra et al. (1994) y Tortorelli (1956, 2009) no indican la presencia de este elemento en el leño de ciprés. Las evidencias halladas en el presente trabajo confirmarían que la formación de trabéculas en el leño de ciprés de la cordillera sería una alteración del xilema, en este caso en respuesta a la presencia del patógeno *P. austrocedri* donde formaría parte del sistema de defensa inducido que posee esta especie.

Otras respuestas del ciprés de la cordillera frente al ataque de *P. austrocedri*, fueron las modificaciones químicas observadas tanto en el floema como en el xilema. Las mismas son: 1) incremento de compuestos fenólicos, 2) variaciones en la concentración de almidón, 3) cambio en la composición química de la resina patológica producida por los canales resiníferos.

1) Incremento de compuestos fenólicos.

En la detección de compuestos fenólicos y taninos en el floema de ciprés afectado por *P. austrocedri*, se observaron tres situaciones:

a) inducción de células PP en la zona sana que limita con la zona de transición; b) acumulación de compuestos fenólicos en las paredes de las fibras y células

parenquimáticas (radiales y axiales) y de taninos en el cambium necrosado y parénquima; y c) pérdida o transformación de los taninos en las células subsidiaras de los canales resiníferos. La primera situación conformaría un sistema de protección inducida por el árbol y de resistencia a la infección inicial; mientras que la segunda, delimitaría una zona para evitar el ingreso de futuros patógenos. La pérdida o transformación de los compuestos tánicos de los canales resiníferos podría estar asociada al traslado de esos compuestos hacia otras partes del tallo.

El ataque de patógenos o insectos y las heridas que causan en los tejidos, pueden inducir un número de respuestas de los vegetales, incluyendo liberación y/o síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, así como sustancias químicas defensivas no proteínicas (Russell y Berryman, 1976; Croteau et al. , 1987, Vad et al. 1991, Gijzen et al. 1993). Las células del parénquima axial especializado en el floema del tronco son un sitio primario de reacciones defensivas a organismos invasores como *Ceratocystis polonica* (Franseschi et al. 1998).

Se sabe que la respuesta de las plantas frente a patógenos, se caracteriza por la acumulación temprana de compuestos fenólicos en el sitio de la infección, dentro de las paredes de la célula, y por el desarrollo limitado del patógeno como resultado de la muerte celular rápida o respuesta hipersensible (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Vance et al. 1980). El papel de ciertos fenólicos (tanto constitutivos como inducidos) en las estrategias de defensa de árboles está bien documentado, particularmente en las coníferas (Brignolas et al. 1998, Schultz y Nicholas, 2000, Bonello y Blodgett, 2003, Lieutier et al. 2003, Venalainen et al. 2003; Wallis et al. 2008). Por otra parte, en el género *Quercus*, los niveles fenólicos constitutivos en los tejidos del floema pueden jugar un papel en la resistencia a la infección inicial de *P. ramorum* (Nagle et al. 2011). Tainter et al. (1999) observaron en roble una reacción distintiva del árbol a la colonización por *P. cinnamomi*, que obliga al hongo a invadir los tejidos en un frente que avanza con un borde uniforme, semejando esto a un inicio incipiente de compartimentalización. El ciprés de la cordillera mostró un comportamiento similar frente a *P. austrocedri*. Esto quedó en evidencia con el test de floroglucinol en corte transversal, donde los radios establecieron un tipo de límite o línea, que podría estar dado por la acumulación de compuestos fenólicos.

Franceschi et al. (2005) han demostrado la activación de células de parénquima polifenólicas (PP), a través de heridas e invasión en la corteza de *Picea abies* con *Ceratocystis polonica*, produciendo la expansión celular y la acumulación de mayores cantidades de compuestos fenólicos (Klepzig et al. 1995; Franceschi et al. 2000; Kusumoto y Suzuki, 2003). Las células PP se encuentran constitutivamente en el floema secundario de especies de Pinaceae y son activas en la síntesis, el almacenamiento y la modificación de compuestos fenólicos (Franceschi et al. 1998, Krekling et al. 2000, Hudgins et al. 2003). Cuando se activan las células PP, liberan compuestos fenólicos en el sitio de la herida, y otros compuestos fenólicos se acumulan lejos de la herida (Franceschi et al. 1998, 2000, Hudgins et al. 2003, Krekling et al. 2004). Varios estudios químicos han demostrado que la producción de compuestos fenólicos se induce rápidamente en la corteza invadida, y que la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos producidos durante la invasión pueden ser bastante diferentes de los fenólicos producidos constitutivamente (Brignoles et al. 1995; Lieutier et al. 1996; Bois y Lieutier, 1997; Viiri et al. 2001; Bonello y Blodget, 2003; Bonello et al. 2003; Hudgins et al. 2004). La activación de las células de PP sugiere una función central común en la protección contra los insectos barrenadores de la corteza, hongos patógenos y plagas en general (Hudgins et al. 2004).

2) Variaciones en la concentración de almidón.

Los estudios histoquímicos de Adams et al. (2016), en madera de *Aquilaria malaccensis* infectada con hongos, mostraron que el almidón es degradado lentamente por los hongos, y que en la región completamente infectada desaparece este carbohidrato.

En la corteza infectada por hongos de la mancha azul, el almidón desaparece (Nagy et al. 2000), mientras que en el floema y en el xilema de *Pinus* sp. infectados con *Cronartium ribicola* hay aumento de almidón, incluso durante una serie de procesos metabólicamente exigentes, tales como la división celular, la acumulación fenólica, y la síntesis de resina secundaria. Estas observaciones indican considerables cambios en los patrones de translocación y partición de carbohidratos por el hongo u hospedante (Hudgins et al. 2005).

Una situación similar en los cambios de concentración y distribución de almidón se estaría dando en el floema de ciprés frente al ataque de *P. austrocedri*, donde en la zonas de transición necrótico-sano, área donde se produce la deformación celular “tipo barrera”, se produce una acumulación de este carbohidrato; mientras que en las zonas más antiguas de la lesión necrótica, el almidón desaparece casi completamente de las células del parénquima axial necrosadas del floema y de las células subsidiarias de los canales resiníferos.

En los radios parenquimáticos del xilema la pérdida de almidón podría estar relacionada con dos situaciones: a) un cambio en la translocación y partición de carbohidratos para dar paso a la circulación de otras sustancias (resinas y fenoles), que luego son vertidas a otros elementos (traqueidas) y sectores del xilema; b) y/o que los carbohidratos sean utilizados por *P. austrocedri* como alimento, en su etapa biotrófica en el tejido xilemático.

3) cambio en la composición química de la resina patológica producida por los canales resiníferos.

La producción de resina fungistática en los canales resiníferos es considerada también una respuesta química del árbol frente al ataque del patógeno. Como se mencionó anteriormente, la resina de los árboles de *A. chilensis* infectados con *P. austrocedri* muestra diferencia en sus perfiles de diterpenos con respecto a la resina proveniente de árboles sanos (isopimara-8(9),15-dien-19-ol es el constituyente más relevante en resinas de árboles infectados). Cuando se estudió la acción de distintas fracciones de la resina sobre el crecimiento del patógeno, se observó que las fracciones con mayor actividad fungistática contenían como mayores constituyentes 18-hidroximanool y el aldehído torulosal. Estos compuestos son productos de la oxidación de manool, y probablemente son producidos por el árbol como respuesta química contra la infección fúngica (Olate et al. 2015).

En lo que se refiere a la presencia del patógeno en el árbol, se hallaron hifas y estructuras reproductivas de *P. austrocedri* tanto en el floema como en el xilema de ciprés de la cordillera, aunque una mayor presencia del patógeno se observó en el primer tejido. En el floema las hifas se desarrollan en sentido axial a través

de las células cribosas y del parénquima axial en forma intra- e intercelular, mientras que en sentido radial lo hacen por los radios parenquimáticos. Este mecanismo de desarrollo y colonización descrito aquí coincide con lo observado por Oh y Hansen (2007) para el caso de *P. lateralis* en *Chamaecyparis lawsoniana*, quienes observaron hifas inter- e intracelulares en células cribosas del floema y especialmente en células de parénquima, las cuales siguen caminos similares a los descritos para otras *Phytophthora* spp. Los resultados alcanzados en el presente estudio indicarían también un patrón similar de infección de *P. austrocedri* en el floema de ciprés de la cordillera a los citados para especies arbóreas de la misma familia. La particularidad sería que es la única *Phytophthora* para la que se ha reportado un mecanismo de colonización, reproducción y avance dentro de los canales resiníferos traumáticos del floema.

Por otra parte, Pogoda y Werres (2004) observaron menos hifas de *P. ramorum* con crecimiento intracelular en el floema que en el xilema de *Rhododendron*. Parke et al. (2007) demostraron que *P. ramorum* coloniza el floema, así como el xilema de *Lithocarpus densiflorus*.

A partir del estudio de la colonización de los tejidos producido por algunas especies de *Phytophthora* que causan lesiones y canchros en el tronco de árboles, se sabe que éstas prefieren la sección del cambium y los tejidos vecinos del floema y el xilema. Usualmente atacan primero al cambium y luego a los tejidos de conducción (Pogoda y Werres 2004). Las observaciones realizadas en los tejidos de ciprés indicarían que *P. austrocedri* sigue este mismo orden, para luego pasar al xilema utilizando los radios parenquimáticos.

Se sabe que muchas especies de *Phytophthora* colonizan las células vivas, comportándose de forma biotrófica en una primera etapa para luego pasar a la forma necrotrofica (Pristou y Gallegly, 1954; Hanchey y Wheeler, 1971; Klareman y Corbett, 1974; Slusher et al. 1974; Coffee y Wilson, 1983). Esto indica un modo de vida semibiotrófico, como el que Vanderplank (1984) describió para *P. infestans*. El hallazgo de hifas colonizando células vivas del floema permite sugerir un modo de vida semibiotrófico para *P. austrocedri* en la etapa de colonización y desarrollo dentro del floema de ciprés de la cordillera.

Los resultados de los estudios histológicos de Pogoda y Werres (2004) indican que *P. ramorum* desarrolla clamidosporas como esporas de reposo en tallos de *Rhododendron* sp. La presencia de estructuras reproductivas y de resistencia

(clamidosporas, oosporas y ensanchamientos hifales), como así también la gran cantidad de hifas observadas en los elementos constitutivos del floema de ciprés, sugiere que *P. austrocedri* cumple la etapa sexual de su ciclo biológico dentro de este tejido de conducción. Por otra parte, la presencia de hifas y otras estructuras del patógeno contribuirían a la disminución del flujo floemático en su etapa biotrófica de desarrollo, para luego producir la interrupción de la conducción por necrosis. Todo esto conllevaría a un debilitamiento general de la planta, situación ésta que estaría relacionada también con la sintomatología externa de la enfermedad del mal del ciprés a campo [decaimiento progresivo de los árboles afectados a lo largo de varios años, o bien abrupto, produciéndose la muerte dentro del primer o segundo año a partir de la aparición de los síntomas (Greslebin y Hansen 2010)].

El taponamiento que producen las hifas en los canales resiníferos traumáticos (“puentes hifales”) podría interpretarse como una defensa mecánica y de supervivencia que desarrolla el patógeno, a fin de disminuir el caudal de resina patológica que produce el ciprés. También, la presencia de sus estructuras reproductoras (oosporas) en estos canales sería una estrategia de supervivencia, por lo que estaríamos frente a un mecanismo de interacción patógeno-árbol para el caso de *P. austrocedri* y ciprés de la cordillera.

En el xilema las hifas se desarrollan intracelularmente en sentido axial a través de las traqueidas, mientras que en sentido radial lo hacen por los radios parenquimáticos de manera intra- e intercelular.

Dentro de las traqueidas el desplazamiento de *P. austrocedri* en el sentido axial y del flujo de agua, le permitiría llegar a otras partes del leño. Brown y Brasier (2007) sugieren que la propagación de *Phytophthora* sp. en el xilema de especies leñosas, puede darle un mayor potencial de supervivencia y una capacidad de colonizar el floema sano en otras parte del árbol.

El paso de las hifas de *P. austrocedri* entre traqueidas y hacia otras zonas del xilema a través de las puntuaciones areoladas está en concordancia con lo citado por Vélez et al. (2012). También este mecanismo de avance es citado por Hudgins (2005) para las hifas intracelulares de *Cronartium ribicola* en traqueidas de *Pinus monticola*, que se extienden hacia las traqueidas adyacentes a través de las puntuaciones areoladas.

El bloqueo de las puntuaciones areoladas y del lumen de las traqueidas producido por las hifas, contribuye a la alteración de la conductividad hidráulica específica del tronco (Vélez et al. 2012). Davison et al. (1994), en sus trabajos sobre xilema y floema de *Eucalyptus marginata* y *Pinus radiata* invadido por *P. cinnamomi*, consideran que la ocupación del xilema puede conducir a la interrupción del transporte de agua y, por lo tanto, a un debilitamiento de la resistencia del hospedante.

Vélez et al. (2012) encontraron que las hifas de *P. austrocedri* son abundantes en los radios xilemáticos, proponiendo que podrían acceder a la albura a través de radios floemáticos. Otras situaciones similares de invasión del leño de coníferas a través de los radios parenquimáticos ocurre con *Phytophthora lateralis* en el xilema de *Chamaecyparis lawsoniana* (Oh y Hansel, 2007), como así también con *Cronartium ribicola* en *Pinus monticola*. En estas especies, la propagación de las hifas en el xilema ocurre primariamente a través de los radios del xilema, para luego pasar a las traqueidas. Las hifas se observan principalmente en los lúmenes de las traqueidas adyacentes a las células de los radios (Hudgins 2005). Existen varios antecedentes de diferentes especies de *Phytophthora* que colonizan el xilema de especies leñosas pudiendo ocasionar una disminución de la conductividad. Pogoda y Werres (2004) observaron que las hifas de *P. ramorum* en *Rhododendron* sp. estaban presentes principalmente en las tráqueas del xilema secundario, y sólo unas pocas en el floema. Los estudios de Parke et al. (2007) en el leño de *Lithocarpus densiflorus* infectado naturalmente por *P. ramorum* muestran que las hifas son abundantes en los vasos del xilema, en el parénquima radial y en las fibrotraqueidas. Como consecuencia de esto los árboles tienen un flujo de savia y una conductividad reducida. Las observaciones anatómicas sugirieron que el transporte de agua en los árboles infectados disminuye por la obstrucción causada por hifas, clamidosporas y tilosis. *Phytophthora ramorum* y *P. kernoviae* infectan la albura de especies de *Quercus* y *Fagus* provocando, al menos, disfunción local del xilema (Brown y Brasier, 2007). También la colonización de las traqueidas del xilema de *Chamaecyparis lawsoniana* estuvo implicada en la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad de raíz de esta especie, causada por *P. lateralis* (Oh y Hansen, 2007).

La presencia de estructuras de resistencia y clamidosporas de *P. austrocedri* en el leño de ciprés, contribuirían también a la disminución del transporte de agua por la obstrucción que causan las mismas dentro de las traqueidas. Por otra parte, también podrían facilitar el movimiento de *P. austrocedri* para su propagación a otras partes del leño, como lo sugieren Brown y Brasier (2007) con respecto a la propagación y supervivencia de *Phytophthora* sp. en el xilema de especies leñosas.

Los resultados obtenidos hasta aquí sobre el mecanismo de desarrollo del *P. austrocedri* en el leño de ciprés de la cordillera nos permiten asegurar que este patógeno se desplaza en sentido radial a través de los radios xilemáticos y en sentido axial a través de las traqueidas. En consonancia con las observaciones de Vélez et al. (2012), este trabajo sustenta que el efecto de la infección del patógeno en el xilema estaría correlacionado con la sintomatología externa que presenta la enfermedad del mal de ciprés. La disminución de la conductibilidad hidráulica y del suministro de agua dentro del tallo estarían relacionados con la clorosis y el cambio de coloración de follaje, seguidos de caída de hojas y decaimiento general de la planta (Greslebin y Hansen, 2010).

Éste es el primer trabajo que describe en detalle la presencia y el mecanismo de colonización y desarrollo de *P. austrocedri* tanto en el xilema como en el floema de ciprés de la cordillera, y contribuye a entender varios aspectos de la sintomatología y patogenicidad de esta enfermedad.

Los resultados obtenidos podrían aplicarse a otras especies de la familia susceptibles al patógeno, y además, la información generada también a otros patosistemas *Phytophthora*-árbol.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- **El primer tejido afectado por *P. austrocedri* es el cambium, luego el floema y por último el xilema.**

En todas las situaciones analizadas de la enfermedad sobre los tejidos de conducción del tronco, (zona de avance, zona media de la lesión y zona inicial), tanto en ejemplares adultos como en ejemplares jóvenes, el cambium vascular fue el primer tejido afectado. Se observó primero una pérdida de turgencia de sus células y luego, a medida que avanza la lesión, se manifestó con sus células totalmente colapsadas y necrosadas. La necrosis del tejido cambial y la acumulación de compuestos fenólicos conforman una respuesta del ciprés frente al ataque de *P.austrocedri*

- **El patógeno causa una necrosis general del tejido floemático (principalmente en su sistema parenquimático) con acumulación de compuestos fenólicos y una malformación del mismo**

El segundo tejido afectado fue el floema, con una necrosis general de las células del parénquima axial y radial, seguido de una acumulación de compuestos fenólicos de la siguiente manera: a) una inducción de células PP en la zona sana que limita con la zona de transición; b) una acumulación de estos compuestos en las paredes de las fibras y células parenquimáticas (radiales y axiales) en la lesiones inoculadas de árboles jóvenes; c) un pérdida o transformación de los taninos en las células subsidiaras de canales resiníferos.

- **La reprogramación del cambium forma canales resiníferos traumáticos y bolsones de resina**

La formación de canales resiníferos traumáticos y bolsones de resina en el floema de ciprés de la cordillera forman parte del sistema de defensa inducido generando mayor cantidad de resina patológica.

- **Las resinas de los canales resiníferos traumáticos obturan los elementos del xilema y del floema**

La obturación de las traqueidas por contenidos resinosos volcados desde los radios, también contribuye a la disminución de la conductibilidad hidráulica del xilema

- **Los tejidos de conducción del ciprés sufren cambios en la concentración de almidón**

En el floema de ciprés afectado por *P. austrocedris* se produce una acumulación de este carbohidrato en la zonas de transición entre la lesión y tejidos sanos, (área donde se produce la deformación celular “tipo barrera”), mientras que en las lesiones el almidón desaparece casi completamente.

La pérdida de almidón en los radios parenquimáticos de ciprés afectado con *P. austrocedri*; estaría relacionada con dos situaciones: a) cambio en la translocación y partición de carbohidratos para dar paso a la circulación de otras sustancias (resinas y fenoles) que luego son vertidas a las traqueidas; b) utilización por *P. austrocedri* como alimento en su etapa de colonización y avance en el tejido xilemático.

- **La reprogramación del cambium produce la deformación de radios y la formación de trabéculas en el xilema**

La desorganización celular observada en el leño de ciprés, constituiría una estructura de defensa anatómica del tipo “zona de barrera” para aislar el xilema del tejido lesionado (cambium y floema). La zona tipo barrera, por sus características anatómicas, no solo formaría un mecanismo de defensa, sino que produciría una disminución de la conductibilidad hidráulica del xilema, debido a la obturación de las traqueidas de los últimos años.

La presencia de trabéculas en el xilema de ciprés sería una anomalía dentro de este tejido producto de la reprogramación del cambium. Las evidencias halladas en el presente trabajo proponen que la formación de trabéculas en el leño de ciprés de la cordillera es una alteración del xilema en respuesta a la presencia del patógeno *P. austrocedri* y podrían formar parte del sistema de defensa inducido que posee esta especie frente al patógeno.

En base a las discusiones y conclusiones expuestas anteriormente, se propone el primer modelo histológico de la afección de *P. austrocedri* en los tejidos de conducción del ciprés (Fig. 55).

Modelo histológico de la afección de *Phytophthora austrocedri* en el floema y xilema de *Austrocedrus chilensis*

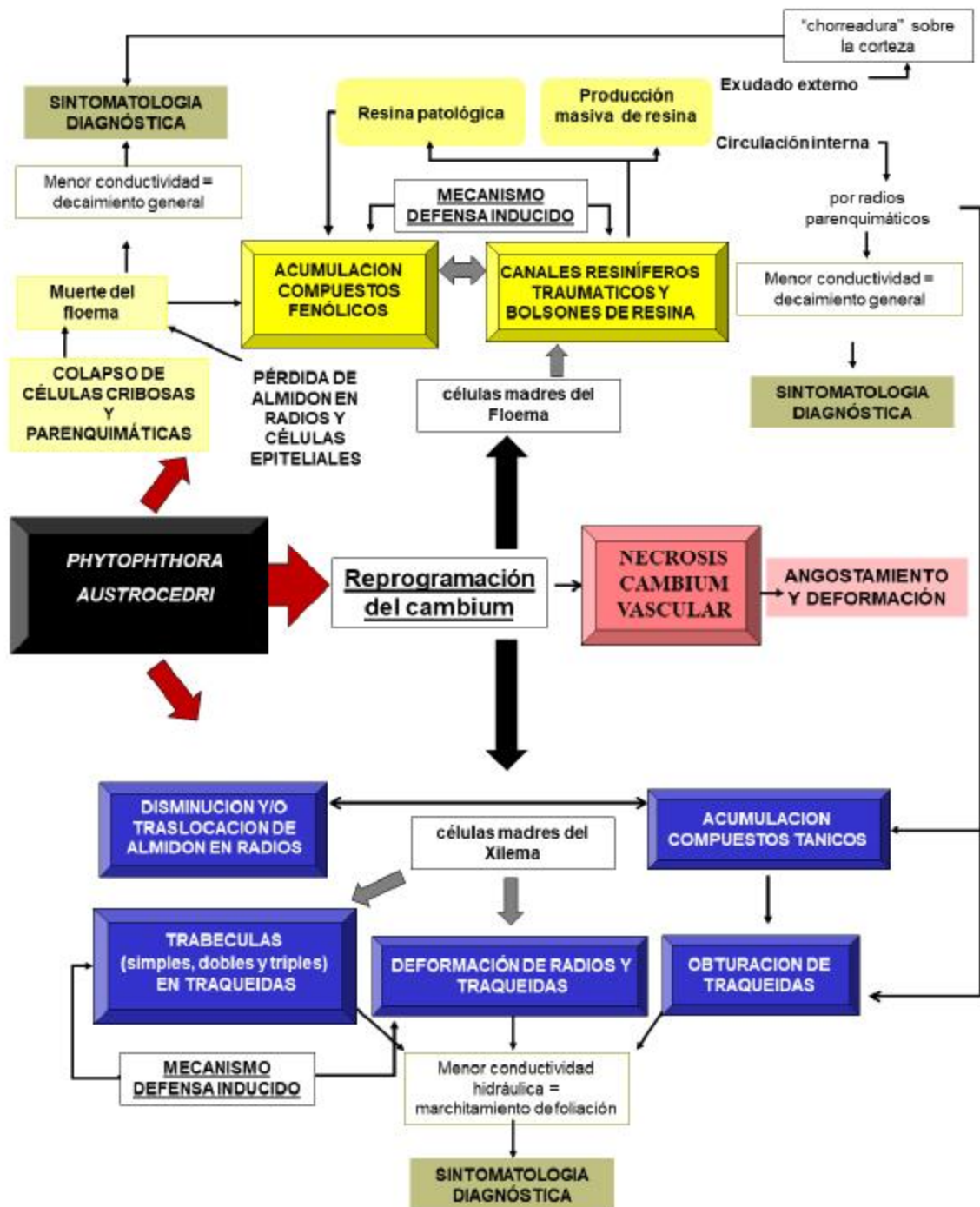


Figura 55. Modelo histológico de la afección de *Phytophthora austrocedri* en floema y xilema secundario de *Austrocedrus chilensis*, respuestas anatómicas de defensa. Invasión de hifas por floema inducen al cambium a la formación de trabéculas en el xilema y canales resiníferos traumáticos en el floema, dando lugar a una forma de defensa inducida. El exceso de resina es transportada radialmente por los radios parenquimáticos y células del parénquima difuso, obturando traqueidas y saturando en contenidos resinosos los radios. Estas resinas limitan junto con las trabéculas, el movimiento circulatorio del agua en el xilema. El desarrollo de hifas continúa por las células cribosas, pasando a través de las áreas cribosas para llegar al parénquima. Esta situación reduce también la circulación de sustancias elaboradas en el floema. El pasaje del floema al xilema se realiza por los radios parenquimáticos en forma intracelular, y el desarrollo de hifas dentro del xilema continúa a través de las puntuaciones areoladas de las traqueidas. La generación de los canales resiníferos traumáticos tratando de limitar el desarrollo y transporte del patógeno, genera una reacción en la elaboración de un mecanismo de defensa del patógeno. El mismo elabora "puentes" transversales de hifas dentro del canal resinífero para limitar la circulación de la resina; y a su vez este gran flujo de resina es transportada hacia otras zonas del leño.

El presente trabajo ha logrado comprobar y describir las diferentes respuestas que ocurren en los tejidos de conducción del ciprés de la cordillera frente al ataque *P. austrocedri*, sin embargo, los mecanismos por los que se desencadenan las mismas son aún desconocidos. Por lo tanto, continúa habiendo una serie de retos para mejorar nuestra comprensión de la interacción de organismos invasores y las estrategias de defensa. Sería de gran utilidad conocer y comprender estos mecanismos de defensa y los de resistencia natural frente a este patógeno, para poder avanzar en la formulación de productos y metodologías concretas para el control de la enfermedad.

Otra de las conclusiones importantes de este trabajo, es el modelo de desarrollo y colonización de *P. austrocedri* en los tejidos conductores de *A. chilensis* que se presenta a continuación.

- *P. austrocedri* se desarrolla dentro del floema y luego en el xilema cumpliendo parte de su ciclo biológico en estos tejidos

El patrón de infección de *P. austrocedris* en el floema de ciprés de la cordillera es similar a los citados para especies arbóreas de la misma familia pero con la particularidad que es la única *Phytophthora* que presenta colonización, reproducción y avance dentro de los canales resiníferos traumáticos del floema. Esto se comprobó por la presencia de oosporas y clamidosporas en dichos canales. En sentido axial, la invasión utiliza principalmente dos elementos del floema a) las células cribosas y b) los canales resiníferos traumáticos. En células cribosas, las hifas y sus ramificaciones obturan el lumen. Para la colonización de

las células del parénquima, las hifas atraviesan las áreas cribosas que comunican con el sistema parenquimático axial y desde allí se extienden hacia los radios.

La presencia de hifas y estructuras del patógeno contribuyen a la disminución del flujo floemático en su etapa biotrófica de desarrollo dentro de este tejido. Luego se produce la disrupción de la conducción por la necrosis de los mismos y todo esto conlleva a un debilitamiento general de la planta.

El mecanismo de desarrollo de *P. austrocedri* en el leño de ciprés de la cordillera, en sentido radial es a través de los radios xilemáticos, y en sentido axial a través de las traqueidas. Su presencia en este tejido contribuye a la interrupción del transporte de agua y por lo tanto a un debilitamiento del ciprés. Esta última situación está relacionada con la sintomatología externa de la enfermedad que presenta esta especie a campo.

En base a lo expuesto anteriormente y los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone el siguiente modelo de desarrollo y colonización de *P. austrocedri* en los tejidos de conducción de ciprés de cordillera (Fig. 56)

Modelo de desarrollo y colonización de *Phytophthora austrocedri* en los tejidos de conducción de *Austrocedrus chilensis*

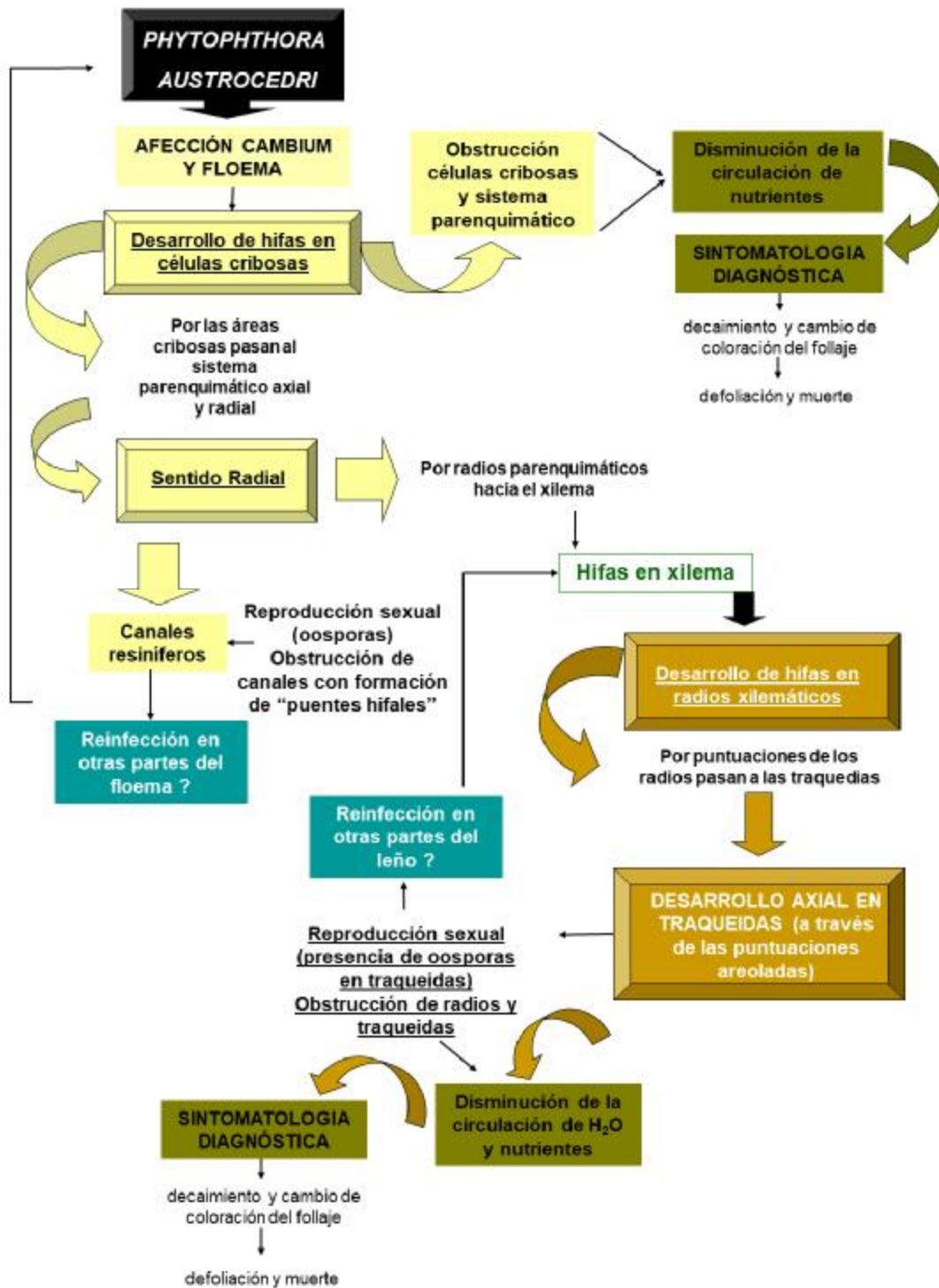


Figura 56. Modelo de desarrollo y colonización de *Phytophthora austrocedri* en los tejidos conductores de *Austrocedrus chilensis*. Las hifas en el floema se desarrollan en las células cribosas y a través de las áreas cribosas pasan al sistema del parénquima radial y axial. En el sentido axial producen la obturación de las células cribosas y parenquimáticas. En sentido radial se desarrolla por los radios parenquimáticos, atravesando el cambium para llegar al xilema. A su vez colonizan los canales resiníferos traumáticos inducidos por el ciprés en el floema. En estos canales el hongo desarrolla su etapa sexual, dejando gran

cantidad de oosporas y posibilitando la re-infección en otras partes del floema. Este desarrollo obstruye y disminuye la circulación de nutrientes, lo que se ve reflejado en la sintomatología externa de la enfermedad (decaimiento general del ciprés, defoliación, muerte). De los radios xilemáticos las hifas pasan a las traqueidas a través de las puntuaciones. En sentido axial, entre traqueidas, el paso de *P. austrocedri* es a través de las puntuaciones areoladas. Dentro de las traqueidas se encuentran también oosporas. Esta forma de colonización del xilema contribuye a la disminución de nutrientes y al fallo hidráulico, y en conjunto se relaciona con el decaimiento general seguido de muerte del ciprés (sintomatología externa de la enfermedad).

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

Adams, S.J, Manohara, T.N.; Krishnamurthy K.V. y Senthil Kumar, T. (2016). Histochemical studies on fungal-induced agarwood. *Indian Journal of Plant Sciences*, 5 (1): 102-110.

Anderson J.P, Thatcher L.F, Singh K.B. (2005). Plant defence responses: conservation between models and crops. *Functional Plant Biology* 32: 21–34.

Bannan, M.W. (1936). Vertical resin ducts in the secondary wood of the Abietineae. *New Phytologist*, 35(1): 11-46.

Bärner, J. (1937). Intrazelluläre Stiibe bei viruskranken Solanaceen und Cucurbitaceen. *Angew. Bot.* 19: 553- 561

Basha, S.A., Sarma, B.K., Singh, D.P., Annapurna, K., y Singh, U.P. (2006). Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiologica*, 51(5): 463-468.

Berryman, A.A. (1972). Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* 22(10), 598–602.

Blanchette R.A. y Biggs A.R (Eds) (1992). Defense mechanisms of woody plants against fungi. Springer Series in Wood Science. Ed. T.E. Timell. 458p.

Blodgett, J.T., Eyles, A., y Bonello, P. (2007). Organ-dependent induction of systemic resistance and systemic susceptibility in *Pinus nigra* inoculated with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Tree Physiology*, 27: 511–517.

Bois E, y Lieutier F. (1997). Phenolic response of Scots pine clones to inoculation with *Leptographium wingfieldii*, a fungus associated with *Tomicus piniperda*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35(10): 819–825.

Bonello P, Storer A.J, Gordon TR, Wood D.L. y Heller, W. (2003). Systemic effects of *Heterobasidion annosum* on ferulic acid glucoside and lignin of presymptomatic ponderosa pine phloem, and potential effects on bark beetle-associated fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 29(5): 1167–1182.

Bonello, P., y Blodgett, J.T. (2003). *Pinus nigra*–*Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(5): 249-261.

Bordasch, R.P., y Berryman, A.A. (1977). Host resistance to the fir engraver beetle, *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae). 2. Repellency of *Abies grandis* resins and some monoterpenes. *The Canadian Entomologist*, 109(01): 95–100.

Brignolas, F., Lieutier, F., Sauvard, D., Christiansen, E., y Berryman, A.A. (1998). Phenolic predictors for Norway spruce resistance to the bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and an associated fungus, *Ceratocystis polonica*. *Canadian Journal of Forest Research*, 28(5): 720-728.

Brown, A.V.; y. Brasier C.M. (2007). Colonization of tree xylem by *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae* and other *Phytophthora* species. *Plant Pathology*, 56(2): 227–241.

Castro, M.A. (2009). Cortezas. Especies leñosas de los bosques andinos patagónicos Argentina. Ed. L.O.L.A. 280p.

Cheniclet, C.; Bernard-Dagan, C. y Pauly, G. (1988). Terpene biosynthesis under pathological conditions. Chapter 6 in Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects. *Springer New York*, pp 117-130.

Chisholm S.T, Coaker G, Day B, Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.

Christiansen, E.; Krokene, P; Berryman, A.A; Franceschi,V.R; Krekling, T; Lieutier, F. Lönneborg, A. y SOLHEIM. H. (1999). Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. *Tree Physiology*, 19(6): 399-403.

Cleary, M.R. y Holmes, T. (2011). Formation of traumatic resin ducts in the phloem of western redcedar (*Thuja plicata*) roots following abiotic injury and pathogenic invasion by *Armillaria ostoyae*. *IAWA Journal*, 32 (3): 351–359.

Coffey, M.D., and Wilson, U.E. 1983. Histology and cytology of infection and disease caused by *Phytophthora*. Pages 289-301 in: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki Garcia, and P.H. Tsao, eds. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.

Collinge, D.B., Gregersen, P.L., y Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity: Modern Approaches and Perspectives*. AS Basra, Ed. Marcel Dekker, New York, pp 391-433.

CONAF, 2011. Catastro de Los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. Monitoreo de Cambios y Actualizaciones. Periodo 1997-2011. <http://sit.conaf.cl/>

Croteau, R., Gurkewitz, S., Johnson, M.A. y FISK, H.J. (1987). Biochemistry of oleoresinosis monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. *Plant Physiology* 85(4): 1123– 1128.

Cruickshank, M.G., Lejour, D. y Morrison D.J.(2006). Traumatic resin canals as markers of infection events in Douglas-fir roots infected with *Armillaria* root disease. *Forest Pathology*, 36(5): 372–384.

D'Ambrosio de Argüeso A. (1986). Manual de técnicas en histología vegetal. 1ra ed. Buenos Aires: Ed Hemisferio Sur S.A. 83p.

Davison E.M., Stukely M.J., Crane C.E. y Tay F.C.S. 1994. Invasion of phloem and xylem of woody stems and roots of *Eucalyptus marginata* and *Pinus radiata* by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 84(4): 335-340.

De Magistris A.A y Castro M.A. (2001). Bark anatomy of southern South American Cupressaceae. *IAWA Journal*, 22(4): 367–383.

Diaz-Vaz, J.E. (1985). *Austrocedrus chilensis*, Descripción Anatómica. Bosque, 6(1): 49-50.

Dodds P.N., Rafiqi M., Gan P.H.P, Hardham A.R, Jones D.A, Ellis J.G. (2009). Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol.* 183: 993–999.

Erize, F.E. (1997). El nuevo libro del Árbol. Tomo I. Ed. Ateneo. 120p.

Evensen, P.C., Solheim, H., Hoiland, K., y Stenersen, J. 2000. Induced resistance of Norway spruce, variation of phenolic compounds and their effects on fungal pathogens. *Forest Pathology*, 30: 97–108.

Eyles, A., Davies, N.W., Yuan, Z.Q., y Mohammed, C. (2003). Host responses to natural infection by *Cytonaema* sp. in the aerial bark of *Eucalyptus globulus*. *Forest Pathology*, 33: 317–331.

Ferreira, R.B, Monteiro S, Freitas R, Santos C.N, Chen Z, Batista L.M, Duarte J, Borges A, Teixeira A.R (2007) The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 8(5): 677-700.

Filip G.M y Rosso P.H. (1999). Cypress mortality (mal del ciprés) in the Patagonian Andes: comparison with similar forest diseases and declines in North America. *European Journal of Forest Pathology*, 29(2): 89–96.

Fink, S. (1986). Microscopical investigations on wood formation and function in diseased trees. *IAWA Journal*, 7 (4): 351-355.

Franceschi, V.R, Krokene, P., Krekling, T., y Christiansen, E. (2000). Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 87(3): 314–326.

Franceschi, V.R.; Krokene, P.; Christiansen, E.; Krekling, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*, 167(2): 353–376.

Franceschi, V.R; Krekling, T; Berryman, A.; y Christiansen, E. (1998). Specialized phloem parenchyma cells in *Norway spruce* (Pinaceae) bark are an important site of defense reactions. *American Journal of Botany*, 85(5): 601–615.

Gallo, L., Martinez Meier, A., Azpilicueta, M. M., Marchelli, P., & Mondino, V. (2005). Subprograma coníferas y otras especies en la región patagónica. Mejores árboles para más forestadores. El Programa de Producción de Material de Propagación Mejorado y el Mejoramiento Genético en el Proyecto Forestal de Desarrollo, Norverto C.A. (ed). Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentos: Buenos Aires.

García, L. E., de Palacios, P.D.P, Casasús, A. G y Fernández, F.G. (2004). Characterisation of the xylem of 352 conifers. *Forest System*, 13(3): 452-478.

Gijzen, M, Lewinsohn, E., Savage, T. J., y Croteau, R. B. (1993). Conifer monoterpenes. Biochemistry and bark beetle chemical ecology. In Bioactive volatile compounds from plants, *American Chemical Society*, Symposium Serie 525: 8–22.

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

Green, S; Elliot, M. Armstrong, A. & Hendry S. J. (2015). *Phytophthora austrocedrae* emerges as a serious threat to juniper (*Juniperus communis*) in Britain. *Plant pathology*, 64(2), 456-466.

Greslebin A.G. y Hansen E.M. (2010). Pathogenicity of *Phytophthora austrocedrae* on *Austrocedrus chilensis* and its relation with mal del ciprés in Patagonia. *Plant Pathology*, 59(4): 604-612.

Greslebin A.G., Hansen E. y Sutton W. (2007) *Phytophthora austrocedrae* sp., a new species associated with *Austrocedrus chilensis* mortality in Patagonia (Argentina). *Mycological Research*, 111(3): 308–316.

Greslebin A.G., Hansen E.M, Winton L. y Rajchenberg M. (2005). *Phytophthora* species from declining *Austrocedrus chilensis* forests in Patagonia, Argentina. *Mycologia*, 97(1): 218-228.

Grosser, D. (1986). On the occurrence of trabeculae with special consideration of diseased trees. *IAWA Journal*, 7 (4): 319-341.

Guerra, P.E., Pasquini, N. M., y Troncoso, O. A. (1994). Estudio xilológico del leño de coníferas nativas de los bosques andino patagónicos. Publicación Técnica 18.

Hale, J.D. (1923). Trabeculae of Sanio, their origin and distribution. The trabeculae of Sanio in angiosperms. *Science*, 57(155): 718.

Hale, J.D. (1935): The structure of wood. In: Canadian woods: Their properties and uses. (Vol. 1) T. A. McELHANNEY and associates Ed., Forest Service Department of Interior. Canada. pp 56-99.

Hanchey, P., y Wheeler, H. (1971). Pathological changes in ultrastructure: Tobacco roots infection with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 61: 33–39.

Hart, J.H. and Hillis, W.E. (1974). Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenols in *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytopathology* 64: 939–948.

Havrylenko M.; Rosso P.H.; Fontenla S.B. Baccalá, N. (1989). *Austrocedrus chilensis*: Contribución al estudio de su mortalidad en Argentina. *Bosques* 10: 29-36.

Hoefert, L.L., y Gifford, Jr., E.M. (1967). Trabeculae in the grapevine infected with leafroll virus. *American Journal of Botany*, 54(2): 257-261.

Hudgins, J. W., Christiansen, E., & Franceschi, V. R. (2003). Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Tree Physiology*, 23(6): 361-371.

Hudgins, J.W., Christiansen E, Franceschi V. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiology*, 24(3): 251–264.

Hudgins, J.W., y Franceschi, V.R. (2004). Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiology*, 135(4): 2134-2149.

Hudgins, J.W.; McDonald, G.I.; Zambino P.J.; Klopfenstein N.B.; y Franceschi V.R. (2005). Anatomical and cellular responses of *Pinus monticola* stem tissues to invasion by *Cronartium ribicola*. *Forest Pathology*, 35(6): 423–443.

Ito K. (1998). Spatial extent of traumatic resin duct induction in Japanese cedar, *Cryptomeria japonica* D. Don, following feeding damage by the cryptomeria bark borer, *Semanotus japonicus* Lacordaire (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology*, 33(4): 561–566.

Jeffrey, E. C. (1917): *The anatomy of woody plants*. University of Chicago Press.

Jung T, Colquhoun I.J, Hardy Gest J. (2013). New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *For. Pathol.* 43: 266–288.

Keith, C. T. (1971). Observations on the anatomy and fine structure of the trabeculae of Sanio. *IAWA Journal*, 3: 3-11.

Klareman, W.L., y Corbett, M.K. (1974). Histopathology of resistance and susceptible soyabean hypocotyls inoculated with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology*, 64(7): 971–975.

- Klepzig, K. D., Kruger, E.L., Smalley, E. B. y Raffa, K. F. (1995). Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. *Journal of Chemical Ecology*, 21(5): 601–626.
- Koornneef A, Pieterse C.M.J. (2008). Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146: 839–844.
- Krekling, T, Franceschi V.R, Krokene, P, y Solheim H. (2004). Differential anatomical responses of Norway spruce stem tissues to sterile and fungus infected inoculations. *Trees*, 18(1): 1–9.
- Krekling, T., Franceschi, V.R., Berryman, A. A., Christiansen, E. (2000). The structure and development of polyphenolic parenchyma cells in Norway spruce (*Picea abies*) bark. *Flora*, 195(4): 354–369.
- Krokene P, Nagy N.E, Solheim H. (2008). Methyl jasmonate and oxalic acid treatment of Norway spruce: anatomically based defense responses and increased resistance against fungal infection. *Tree Physiology* 28: 29-35.
- Krokene, P.; Solheim, H.; Krekling, T. y Christiansen, E. (2003). Inducible anatomical defense responses in Norway spruce stems and their possible role in induced resistance. *Tree Physiology Victoria*, 23(1): 191–198.
- Kuroda, K. (1998). Seasonal variation in traumatic resin canal formation in *Chamaecyparis obtusa* phloem. *IAWA Journal*, 19(2): 181 – 189.
- Kusumoto D., y Suzuki, K. (2003). Spatial distribution and time-course of polyphenol accumulation as a defense response induced by wounding in the phloem of *Chamaecyparis obtusa*. *New Phytologist*, 159(1): 167–173.
- La Manna L y Rajchenberg M. (2004). Soil properties and *Austrocedrus chilensis* forest decline in Central Patagonia, Argentina. *Plant and Soil*, 263(1): 29–41.
- La Manna, L., Greslebin, A. G., & Matteucci, S. D. (2013). Applying cost-distance analysis for forest disease risk mapping: *Phytophthora austrocedrae* as an example. *European journal of forest research*, 132(5-6): 877-885.
- Leborgne-Castel N, Adam T, Bouhidel K. (2010). Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma* 247: 177–193.
- Lieutier, F., Brignolas, F., Sauvard, D., Yart, A., Galet, C., Brunet, M., y van de Sype, H. (2003). Intra-and inter-provenance variability in phloem phenols of *Picea abies* and relationship to a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology-Victoria*, 23(4): 247-256.
- Lieutier, F., Sauvard, D., Brignolas, F., Picron, V., Yart, A., Bastien, C. y Jay-Allemand, C. (1996). Changes in phenolic metabolites of Scots pine phloem induced by *Ophiostoma brunneo-cilatum*, a bark beetle-associated fungus. *European Journal of Forest Pathology*, 26(3): 145–158.

Madriz Ordeñaña, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo integrado de Plagas. CATIE. 63: 22-32.

Mameli, E. 1913. Sulla presensa de cordoni endocel- lulari nella viti sane e in quelle affette da roncet. Rend. Accad. Lincei. 22: 879-883.

Martin, D., Tholl, D., Gershenzon J, y Bohlmann, J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiology* 129(3): 1003–1018.

Mauch-Mani, B. & Slusarenko, A.J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, 8, 203–212.

Martinuzzi F. 2008. INTI Maderas y muebles. Ficha técnica de maderas: *Austrocedrus chilensis*. Revista Cema (Cámara de Empresarios Madereros y Afines) N° 91

Miller, B., Madilao L., Ralph, S., Bohlmann, J. (2005). Insect-induced conifer defense: White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce. *Plant Physiology*, 137(1): 369–382.

Mysore K.S, Ryu C.M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9: 97-104.

Nagle, A.M., Mcphersonb. A., Wood, D.L., Garbelotto, M. y P. Bonello. (2011). Relationship between field resistance to *Phytophthora ramorum* and constitutive phenolic chemistry of coast live oak. *Forest Pathology*, 41(6): 464-469.

Nagy N, Franceschi V.R, Solheim H, Krekling T, y Christiansen E. (2000). Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae): Anatomy and cytochemical traits. *American Journal of Botany*, 87(3): 302–313.

Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of Phytopathology* 30: 369–389

Nürnberg T, Lipka V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into and old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6:335-345.

Oh, E. y Hansen, E.M. (2007). Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology*, 97(6): 684-693.

Olate, V.R.; Vélez, M.L.; Greslebin, A. y Schmeda-Hirschmann, G. (2015). *Phytophthora austrocedri* Elicites Changes in Diterpene Profile of *Austrocedrus chilensis*. *Molecules*, 20(8): 15084-15097.

Osbourn A.E. (2001). Plant mechanisms that give defence against soilborne diseases. *Australasian Plant Pathology* 30: 99–102.

Parke J.L., Oh E., Voelker S., Hansen E.M., Buckles, G., y Lachenbruch B. (2007). *Phytophthora ramorum* colonizes tanoak xylem and is associated with reduced stem water transport. *Phytopathology*, 97(1):1558-1567.

Pastorino M.J., Fariña M.M, Donaldo Bran D. y Gallo L.A. (2006). Extremos geográficos de la distribución natural de *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41(3-4): 307-311.

Pieterse, C.M., y van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in plant science*, 4(2): 52-58.

Pogoda F. y Werre S. (2004). Histological Studies of *Phytophthora ramorum* in *Rhododendron* Twigs. *Canadian Journal of botanic*, 82(10), 1481–1489.

Pristou, R., y Gallegly, M.E. (1954). Leaf penetration by *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 44: 81–86.

Raatz, W. (1892). Die Stabbildungen im secundaren Holzkörper der Baume und die Initialentheorie. *Jahrb.wiss.Bot.* 23: 567-636.

Raffa, K.F., y Berryman, A.A. (1983). Physiological aspects of lodgepole pine wound responses to a fungal symbiont of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Canadian Entomologist*, 115(07): 723–734.

Reid, R.W., Whitney, H.S., y WATSON, J.A. (1967). Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungus. *Canadian Journal of Botany*, 45(7): 1115–1126.

Richter G.H, Grosser D., Heinz I. y Gasson P.E. (2004). IAWA List Of Microscopic Features for Softwood Identification by an IAWA Committee. *IAWA Journal*, 25; (1): 1-70.

Rivera Nava, L., Quintanar Isaías, A., & Pérez Olvera, C.D.L.P. (1999). Comparación histoquímica de albura y duramen de tres especies de *Quercus*. *Madera y Bosques*, 5(1):27-41.

Roig, F.A. (1992). Comparative Wood Anatomy Of Southern South American Cupressaceae. *IAWA Journal*, 13(2): 151-162.

Rosso, P.H.; Baccala N.; Havrylenko M. y Fontenla S. (1994). Spatial pattern of *Austrocedrus chilensis* wilting and the scope of autocorrelation analysis in natural forests. *Forest Ecology and Management* 67(1-3): 273–279.

Russell, C.E. y Berryman, A.A. (1976). Host resistance to the fir engraver beetle. 1. Monoterpene composition of *Abies grandis* pitch blisters and fungus-infected wounds. *Canadian Journal of Botany*, 54(1-2): 14–18.

Ryals, J.A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. y Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.

Schneiders, E. (1937). über die Zellstübe und ihre phytopathologische Bedeutung. *Gartenbauwissenschaft* 11(2): 237-250.

Schneiders, E. (1958). Die Zellstübe- oder Stauchekrankheit unter besonderer Berücksichtigung der Reisigkrankheit der Rebe. Sigurd Horn Verlag, Frankfurt am Main.

Schultz, T.P. y Nicholas, D.D. (2000). Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54(1): 47-52.

Shrimpton, D.M. y Whitney, H.S. (1968). Inhibition of growth of blue stain fungi by wood extractives. *Canadian Journal of Botany*, 46 (6): 757-761.

Silva, P. V., Vélez, M. L., Hernández Otaño, D., Nuñez, C., & Greslebin, A. G. (2016). Action of fosetyl-al and metalaxyl against *Phytophthora austrocedri*. *Forest Pathology*, 46(1), 54-66.

Slusarenko A.J, Schlaich N.L. (2003). Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Molecular Plant Pathology* 4: 159-170

Slusher, R.L., Haas, D.L., Carothers, Z.B., y Sinclair, J.B. (1974). Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soyabean rootlets. *Phytopathology*, 64(6): 834–840.

Smith, A.H., Gill, W.M., Pinkard, E.A., y Mohammed, C.L. (2007). Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *Forest Pathology*, 37(6): 361-373.

Tainter, F. H., Jolley, L., Hernandez, A., Orozco, F., and Van Arsdel, E. P. 1999. Histology of the zone line in secondary phloem of Mexican oak trees infected with *Phytophthora cinnamomi*. in: Proc. First Int. Meet. Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems, IUFRO Working Party 7.02.09, Grants Pass, OR. pp 71-74

Thomson, R.B y Sifton, H.B. (1926). Resin Canals in the Canadian Spruce (*Picea canadensis* (Mill.) B.S.P.)-An Anatomical Study, Especially in Relation to Traumatic Effects and Their Bearing on Phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 214: 63-111.

Tippett, J.T. y Shigo, A.L. 1981. Barrier zone formation: A mechanism of tree defense against vascular pathogens. *IAWA Journal*, 2 (4): 163-168.

Tortorelli, L.A. (1956) Maderas y bosques argentinos. Buenos Aires. Editorial ACME, SACI. 910 pp.

Tortorelli, L.A. 2009. Maderas y Bosques Argentinos. 2da Edición, Ed. Orientación Gráfica, Buenos Aires, Tomo II, 595 pp.

Troncoso, O.; Greslebin A.G.; & Vélez M.L. (2014). Histopathology of *Phytophthora austrocedri* in *Austrocedrus chilensis*. The 7th Meeting of the International Union of Forest Research Organizations IUFRO Working Party 7.02.09. Phytophthora in Forests & Natural Ecosystems 9th - 14th November, Esquel, Argentina

Vad, K., Mikkelsen, J.D. y Collinge, D.B. (1991). Induction, purification and characterization of chitinases isolated from pea leaves inoculated with *Ascochyta pisi*. *Planta*, 184(1): 24–29.

Vance, C.P, Kirk, T.K y Sherwood, R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual review of Phytopathology*, 18(1): 259-288.

Vanderplank, J.E. (1984). Disease resistance in plants. 2nd Ed. Academic Press, Orlando, San Diego 107-116.

Vélez, M.L., Silva, P.V., Troncoso, O.A. y Greslebin A.G. (2012). Alteration of physiological parameters of *Austrocedrus chilensis* by the pathogen *Phytophthora austrocedrae*. *Plant Pathology*, 61(5): 877-888.

Vélez, M.L.; Coetzee, M.P.A., Wingfield, M.J., Rajchenberg, M. & Greslebin, A. G. (2014) Evidence of low levels of genetic diversity for the *Phytophthora austrocedrae* population in Patagonia, Argentina. *Plant Pathology*, 63(1) 212-220.

Vélez, M.L.; Salgado-Salomon ME, Palleres Balboa TSA, Loguercio M, Flass Posse G, Galván M, Greslebin, A G (2014) Patogenicidad de *Phytophthora austrocedrae* en especies nativas e implantadas de la familia Cupressaceae en Patagonia, Argentina. VI Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Temuco, Chile.

Venäläinen, M., Harju, A.M., Kainulainen, P., Viitanen, H., y Nikulainen, H. (2003). Variation in the decay resistance and its relationship with other wood characteristics in old Scots pines. *Annals of Forest Science*, 60(5): 409-417.

Viiri, H, Annila, E., Kitunen, V., Niemelä, P. (2001). Induced responses in stilbenes and terpenes in fertilized Norway spruce after inoculation with blue-stain fungus, *Ceratocystis polonica*. *Trees – Structure and Function*, 15(2): 112–122.

van Kan JAL. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11: 247-253.

van Loon L.C, Rep M, Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. 44: 135-62.

von Müller-Stoll, W.R. (1965). Über intrazelluläre Stäbchenbildungen (Trabeculae) im Holz als anatomische Eigenart bei Gehölzen exponierter Gebirgslagen. *Die Kulturpflanze* 13(1): 763-799.

Wallis, C., Eyles, A., Chorbadian, R., McSpadden Gardener, B., Hansen, R., Cipollini, D., y Bonello, P. (2008). Systemic induction of phloem secondary metabolism and its relationship to resistance to a canker pathogen in Austrian pine. *New Phytologist*, 177(3): 767-778.

Walters, D., Walsh, D., Newton, A., y Lyon, G. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95(12): 1368-1373.

Wehrmeyer, W. (1960). Die Bildung "intrazellulär" Stäbchen nach Virus-Infektion. *Naturwissenschaften*, 47: 236-237.

Werker, E. y Baas, P. (1981). Trabeculae of resin in secondary tissues of *Inula viscosa* (L.) Desf. and *Salvia fruticosa* Mill. *IAWA Journal*, 2 (2-3): 69-79.

Woodward, S. and Pearce, R.B. (1988). The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 127–149.

Yamada, T.; Hasegawa, E.; y Miyashita; S.I. (2003). Resinous stem canker development during the growing season of *Chamaecyparis obtusa* (Hinoki cypress) inoculated with pathogenic fungus *Cistella japonica*. *Forest Pathology*, 33(3): 181–189.

Yamada, T.; Nagashima, M; Kawaguchi, C.; Otsuki, K.; y Yanagita, N. (2002). Seasonal resin canal formation and necrosis expansion in resinous stem canker-affected *Chamaecyparis obtusa*. *Forest Pathology* 32(4-5): 213–224.

Yamanaka, K. (1989). Formation of traumatic phloem resin canals in *Chamaecyparis obtusa*., 10(4): 384 – 394.

Yumoto, M. (1984) The trabecula and its related structures. Lab. of Wood Physics, Faculty of Agriculture, *Research Bulletins of The College Experiment Forests Hokkaido University*, 41(1): 205-259.