



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

**ESPECIES ARBÓREAS Y ARBUSTIVAS NATIVAS COMO
HOSPEDEROS NATURALES O POTENCIALES DE *Phytophthora
pseudosyringae* Jung & Delatour: AGENTE CAUSAL DEL CANCRO
GOMOSO EN *Nothofagus alpina* Y *N. obliqua*.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

MARIELA PAZ GONZALEZ ARRIAGADA
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Eugenio Sanfuentes VS.
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

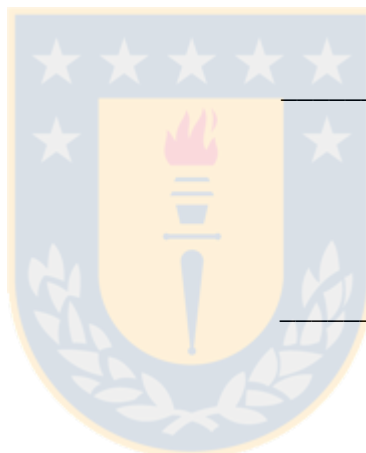
ESPECIES ARBÓREAS Y ARBUSTIVAS NATIVAS COMO HOSPEDEROS NATURALES O POTENCIALES DE *Phytophthora pseudosyringae* Jung & Delatour: AGENTE CAUSAL DEL CANCRO GOMOSO EN *Nothofagus alpina* Y *N. obliqua*.

Comisión Evaluadora:

Eugenio Sanfuentes Von Stowasser
(Profesor Guía)
Ingeniero Forestal, Dr. _____

Gastón González
(Profesor Co-Guía)
Ingeniero Agrónomo, Ms. Cs _____

Eduardo Mizubuti
(Comisión evaluación)
Ingeniero Agrónomo, Dr. _____



Director de Postgrado
Regis Texeira Mendonca
Químico, Dr. _____

Decano Facultad de Ciencias Forestales
Jorge Cancino
Ingeniero Forestal, Dr. _____

AGRADECIMIENTOS



Gracias a todos quienes me acompañaron
en el comienzo de este lindo camino
hacia la fitopatología

RESUMEN

La mortalidad de *Nothofagus* en la región centro-sur de Chile se ha observado por más de 30 años. En 2015, se determinó que el agente causal de la defoliación parcial y el cancro gomoso en *Nothofagus obliqua* y *N. alpina* correspondía a *Phytophthora pseudosyringae*. Debido al daño potencial que este patógeno podría generar en los bosques de *Nothofagus*, el objetivo de la investigación fue determinar los huéspedes nativos potenciales que normalmente crecen en los bosques de *N. obliqua* y *N. alpina*. Durante 2016, se seleccionaron dos rodales de *N. obliqua* para la investigación, que poseían árboles de *N. obliqua* con síntomas descritos para *P. pseudosyringae*. En ambos rodales, en dos temporadas, se recolectaron muestras de especies nativas con diferentes síntomas que se asemejan a los generados por las especies de *Phytophthora*. El tejido sintomático obtenido de las diferentes especies se colocó en medio selectivo V8 - PARPH y los aislamientos obtenidos se identificaron mediante características morfológicas y partidores especie-específicos (Ypseu) para *P. pseudosyringae*. Se realizaron pruebas de patogenicidad en ocho especies nativas mediante la inoculación de tallos y hojas en condiciones de invernadero, evaluando la longitud del lesión y los síntomas necróticos, respectivamente. Para determinar el potencial de esporulación de *P. pseudosyringae* en hojas de especies nativas se realizó un ensayo de inoculación mediante la aplicación de una suspensión de zoosporas de patógenos en el haz y el envés de la hoja mediante microgota, y la posterior incubación en condiciones de cámara húmeda durante cinco días, la cantidad de esporangios y ocurrencia de síntomas necróticos fueron cuantificados.

En los rodales, solo en las plantas de regeneración de *Persea lingue* se determinó *P. pseudosyringae* causando necrosis en brotes y hojas. Adicionalmente, el patógeno se aisló de cancro gomoso de árboles de *N. obliqua*. En la prueba de patogenicidad, se estableció que *P. pseudosyringae* produce cancro en tallos en *N. obliqua*, *Nothofagus dombeyi* y *P. lingue* y causa necrosis foliar en plantas de *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba*, *P. lingue* y *Peumus boldus*. Se determinó que *P. pseudosyringae* tiene la capacidad de esporular en hojas asintomáticas y / o necrosadas de *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba* y *S. macrocarpa*, lo que indica una posible función como fuente del inóculo del patógeno en el ciclo de la enfermedad en el bosque de *Nothofagus*.

Palabras clave: enfermedades en *Nothofagus*, ciclo de vida de *Phytophthora*, *Phytophthora* aérea.



ABSTRACT

Mortality of *Nothofagus* trees in the south-central region of Chile has been observed for more than 30 years. In 2015, was determined that the causal agent of partial defoliation and bleeding canker in *Nothofagus obliqua* and *N. alpina* corresponded to *Phytophthora pseudosyringae*. Due to the potential damage that this pathogen could generate in *Nothofagus* forests, the objective of the investigation was determine potential native hosts normally growing in the *N. obliqua* and *N. alpina* forests. During 2016, two *N. obliqua* stands were selected to the research, because these had *N. obliqua* trees with symptoms described to *P. pseudosyringae*. In both stands, in two seasons, were collected samples from native species with different symptoms reassembling to *Phytophthora* species. Symptomatic tissues obtained from different species were placed in selective medium V8 – PARPH and the isolates obtained were identified using morphological characteristics and species-specific primers (Ypseu) to *P. pseudosyringae*. Pathogenicity tests were carried out on eight native species by stems and leaves inoculation in greenhouse conditions, evaluating canker length and necrotic symptoms, respectively. To determinate the sporulation of *P. pseudosyringae* in native tree species was used detached leave assay, and the inoculation was applying suspensions of pathogen zoospores. Followed, incubation in wet chamber conditions for five days, sporangia quantity and necrotic symptoms occurrence were quantified.

In the field samplings, only in *Persea lingue* regeneration plants was determinate *P. pseudosyringae* causing necrosis in shoots and leaves. Additionally, the pathogen was isolated from bleeding cankers of *N. obliqua* trees. In the pathogenicity test, was established that *P. pseudosyringae* produce stems cankers in *N. obliqua*, *Nothofagus dombeyi* and *P. lingue* and causes leaf necrosis in plants of *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba*, *P. lingue* and *Peumus boldus*. It was determined that *P. pseudosyringae* had the capacity to sporulate in asymptomatic and/or necrosed leaves of *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba* and *S. macrocarpa*, indicating a possible function how inoculum source of the pathogen in the disease cycle in the *Nothofagus* forest.

Keywords: *Nothofagus* disease, *Phytophthora* life cycle, aerial *Phytophthora*.

TABLA DE CONTENIDO

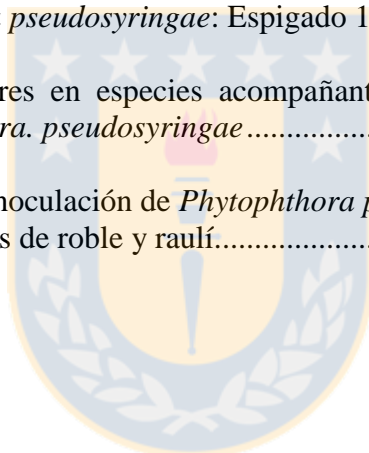
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	VI
TABLA DE CONTENIDO.....	VII
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bosques caducifolios dominados por especies de <i>Nothofagus</i>	1
1.1.1 Bosque dominado por <i>Nothofagus obliqua</i> (roble).....	1
1.1.2 Bosque dominado por <i>Nothofagus alpina</i>	2
1.1.3. Bosque mediterráneo-templado andino de <i>Nothofagus alpina</i> y <i>N. obliqua</i>	3
1.2. Mortalidad en bosques de roble y raulí.....	3
1.3. Importancia de especies de <i>Phytophthora</i> y <i>P. pseudosyringae</i> en ambientes forestales	5
1.4. Modelo epidemiológico de <i>P. ramorum</i> como base el estudio del ciclo de <i>P. pseudosyringae</i>	9
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
2.1. Hipótesis	11
2.2. Objetivo general.....	11
2.3 Objetivos específicos	11
III. METODOLOGÍA.....	12
3.1 Lugares de muestreo	12
3.2 Colecta de muestras y aislamientos de <i>Phytophthora</i>	12
3.2.1 Aislamiento desde árboles de <i>Nothofagus</i>	12
3.2.2 Aislamiento desde follaje de especies acompañantes	13
3.3 Identificación de las especies de <i>Phytophthora</i>	13
3.3.1 Identificación morfológica	13
3.3.2 Identificación molecular:	13
3.4 Pruebas de patogenicidad.....	14
3.4.1 Inoculaciones de <i>P. pseudosyringae</i> en especies acompañantes	14
3.5 Potencial de esporulación de <i>P. pseudosyringae</i> en especies acompañantes	17

IV.	RESULTADOS.....	18
4.1	Colecta de muestras y aislamiento.....	18
4.2	Identificación de las especies de <i>Phytophthora</i>	20
4.3	Ensayos de patogenicidad.....	23
4.3.1	Inoculación en tallo.....	23
4.3.2	Inoculación en hojas.....	27
4.4	Potencial de esporulación en hojas.....	29
V.	DISCUSION.....	33
VI.	CONCLUSIONES.....	42
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	43



INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Hospederos de <i>Phytophthora pseudosyringae</i> , incluyendo aislados colectados desde suelo rizosférico	7
TABLA. 2. Especies arbóreas y arbustivas del tipo de bosque roble raulí inoculadas con aislados de <i>Phytophthora pseudosyringae</i>	16
TABLA 3. Aislados de <i>Phytophthora pseudosyringae</i> obtenidos desde tejido sintomático, colectados desde dos sectores de la Región del Biobío.	21
TABLA 4. Dimensión (µm) de estructuras asexuales, esporangios (30) de aislados de <i>Phytophthora pseudosyringae</i>	22
TABLA 5. Síntomas en follaje, ocurrencia de cancro (C), mortalidad (M%) y re-aislamiento (+) desde el cuello de especies arbóreas y arbustivas inoculadas con dos aislados de <i>Phytophthora pseudosyringae</i> : Espigado 1 (E1) y Ralco 6 (R6).	25
Tabla 6. Síntomas foliares en especies acompañantes inoculadas con suspensión de zoosporas de <i>Phytophthora. pseudosyringae</i>	29
TABLA 7. Efecto de la inoculación de <i>Phytophthora pseudosyringae</i> en tallos y hojas de ocho especies del bosques de roble y raulí.....	32



INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Árboles de *Nothofagus obliqua* con síntomas del cancro gomoso (CGN) en Santa Bárbara. Defoliación (a), canchros con gomosis (b) y necrosis subcortical (c)..... 18
- FIGURA 2. Síntomas en árboles de *Nothofagus obliqua* en sector de Espigado. Defoliación (a), exudación de goma en el fuste (b) y (c)..... 19
- FIGURA 3. Síntomas observados en *Persea lingue* en predio Espigado. Defoliación (a) y cancro con exudación de goma en árboles adultos (b) y tizón apical en regeneración (c). 20
- FIGURA 4. Estructura asexual (esporangio) (A) y sexual (oogonio y anteridio) (B) de aislados de *Phytophthora pseudosyringae*. 23
- FIGURA 5. Evolución de síntomas en plantas de *Persea lingue* inoculadas con *Phytophthora pseudosyringae* aislado Espigado 1. a) Planta antes de la inoculación, b) marchitez foliar incipiente en la primera semana, c) marchitamiento y decoloración en la semana dos, d) inicio de necrosis en la tercera semana y e) necrosis foliar en la cuarta semana. 24
- FIGURA 6. Longitud de lesión en tallos de plantas de especies del tipo de bosque roble raulí inoculadas con aislados de *Phytophthora pseudosyringae*, Espigado 1 (E1) y Ralco 6 (R6). a) *Laurelia semprevirens*, b) *Nothofagus obliqua*, c) *Nothofagus dombeyi*, d) *Persea lingue*, e) *Aextoxicon semipunctatum*, f) *Cryptocarya alba*, g) *Peumus boldus* y h) *Sophora macrocarpa*..... 26
- FIGURA 7. Síntomas en hojas luego de una y dos semanas post inoculación con suspensión de zoosporas de *Phytophthora pseudosyringae* en cuatro especies nativas. *Nothofagus obliqua* (a), *Persea lingue* (b), *Cryptocarya alba* (c) y *Nothofagus dombeyi* (d). De izquierda a derecha: semana 1 y semana 2. 28
- FIGURA 8. Síntomas en hojas inoculadas con *Phytophthora pseudosyringae*. *Nothofagus obliqua* (a), *N. dombeyi* (b), *Persea lingue* (c) y *Cryptocarya alba* (d). De izquierda a derecha, inoculado en haz y envés. 30
- FIGURA 9. Número de esporangios formados en el haz de hoja inoculadas con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora pseudosyringae*. Letras sobre barras indican diferencias significativas. 31
- FIGURA 10. Número de esporangios de *Phytophthora pseudosyringae* (1 cm²) formados en el envés de hojas inoculadas con una suspensión de zoosporas del patógeno. Letras sobre barras indican diferencias significativas. 31

I. INTRODUCCIÓN

En Chile la superficie de bosque nativo alcanza a 14.411.031 hectáreas, representado el 81,5% de los recursos forestales del país y 19% de la superficie de Chile continental. En el país, la región del Biobío posee el 5,8% del bosque nativo del país, representado principalmente por el tipo forestal roble-raulí-coihue, con 61% del total regional (514.059 ha.) y 31% a nivel nacional. Los tipos forestales en que predominan especies de *Nothofagus* (lenga, coihue de Magallanes, roble-raulí-coihue, coihue-raulí-tepa y roble-hualo), son de gran importancia económica y ecológica para Chile, no solo porque en su conjunto representan sobre el 55% de la superficie total de los bosques nativos, sino también por su alto valor maderero (CONAF, 2017).

El género *Nothofagus* pertenece a la familia *Nothofagaceae*, y comprende alrededor de cuarenta y dos especies forestales de hoja caduca y de hoja perenne, con exclusiva distribución en el Hemisferio Sur (Heenan y Smissen, 2013). Las especies de *Nothofagus* se encuentran distribuidas en América del Sur (suroeste de Argentina y Chile), Australia (sudeste de Australia y Tasmania), Nueva Zelanda, Nueva Guinea (Papúa Nueva Guinea, Nueva Bretaña y las islas de D'Entrecasteaux) y Nueva Caledonia. En Chile, diez especies de *Nothofagus* son nativas, tres siempreverdes y siete caducifolias, dominando bosques templados y subantárticos distribuidos entre 33° y 56° de latitud sur (Donoso 1987). Dentro de estas especies destacan por su potencial económico los bosques caducifolios de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst (roble) y *N. alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst. (syn. *N. nervosa*) (raulí).

1.1 Bosques caducifolios dominados por especies de *Nothofagus*.

1.1.1 Bosque dominado por *Nothofagus obliqua* (roble)

A lo largo de su distribución geográfica las especies acompañantes de roble varían en su composición florística. En la zona intermedia mediterránea, en las Regiones del Libertador Bernardo O'Higgins y del Maule *N. obliqua* se encuentra asociado con especies de tipo esclerófilo como *Cryptocarya alba* (Molina) Looser y *Peumus boldus* Molina.

En el mediterráneo andino crece junto a *Austrocedrus chilensis* (D. Don), acompañado de las especies esclerófilas *Quillaja saponaria* Molina y *Lithrea caustica* Hook & Harn., además de

N. glauca (Phil.) Krasser que se encuentra abundantemente distribuido en la cordillera de Linares, con un diverso estrato arbustivo, predominando *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz, *Gevuina avellana* Molina, *Luma apiculata* (DC) Burret, *Lomatia dentata* (Ruiz & Pav.) R.Br., *L. hirsuta* Diels ex J.F. Macbr., *Sophora macrocarpa* J.E. Sm y *Ugni molinae* Turcz. En el mediterráneo templado costero se asocia a *Gomortega keule* (Molina) Baillon en rodales que se encuentran restringidos, destacándose especies como *Podocarpus saligna* D. Don, *G. avellana*, *L. dentata*. En las zonas más templadas, *N. obliqua* es acompañado por *Persea lingue* (Ruiz & Pav) Nees ex Kopp y *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul., en el estrato superior junto a *P. saligna* y *Eucryphia cordifolia* Cav., y con las especies arbustivas *Ribes trilobum* Meyen y *Rhamnus diffusus* Clos, siendo su distribución principalmente costera con influencia marina al sur de la cordillera de Nahuelbuta, generando condiciones de mayor humedad que las encontradas en la asociación con *C. alba*. En la costa el bosque dominado por *N. obliqua* también forma parte de la composición mixta junto a *N. dombeyi* cercano a la cordillera de Nahuelbuta conformándose un mosaico de asociaciones de gran complejidad frecuentemente compuestas por componentes laurifolios como *Weinmannia trichosperma* Ruiz & Pav., *Laureliopsis philippiana* (Looser) R. Schodde, *Aextoxicon punctatum* Ruiz & Pav., *P. saligna* y *P. lingue* y, donde el estrato arbustivo está compuesto principalmente por *G. avellana*, *Dasyphyllum diacanthoides* (D. Don) Cabrera, *U. molinae* y *L. apiculata*. En el clima mediterráneo-templado andino se asocia con *N. alpina* (ver 3.1.3) y con *N. pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser como especie secundaria (Luebert y Pliscoff, 2006).

1.1.2 Bosque dominado por *Nothofagus alpina*

La distribución de *N. alpina* se encuentra más limitada comparada con *N. obliqua*. Según Luebert y Pliscoff (2006) su asociación en el bosque templado costero con *P. lingue* está también relacionada con otras especies de *Nothofagus* como *N. obliqua* y *N. dombeyi* en el estrato arbóreo, mientras que en la zona intermedia destacan especies como *G. avellana*, *P. lingue*, *D. diacanthoides* y *Desfontainia spinosa* Ruiz & Pav. en el estrato arbustivo, en ambas vertientes de la cordillera de Nahuelbuta y donde la alta precipitación y baja influencia oceánica están presentes. En los bosques del mediterráneo-templado andino se encuentra asociado a *N. obliqua* (ver 3.1.3) y en los bosques del templado andino junto a *D. diacanthoides* y componentes del bosque laurifolio como *A. punctatum*, *P. lingue*, *L.*

semperveris, *L. philiphiana* en el estrato arbóreo inferior, y junto con *N. dombeyi* ambos dominando el estrato arbóreo superior, mientras que en el estrato arbustivo *Azara lanceolata* Hook, *Chusquea culeou* (Desvaux), *Maytenus magallanica* (Hook), *Berberis trigona* Kunza ex (Poepp. & Endl.) y ocasionalmente, *L. philippiana*.

1.1.3. Bosque mediterráneo-templado andino de *Nothofagus alpina* y *N. obliqua*

Bosque caducifolio dominado por *N. obliqua* y *N. alpina*, en donde la distribución y composición florística está fuertemente dominada por la exposición. Dentro de las especies que acompañan frecuentemente este tipo de bosque destacan *A. punctatum*, *P. lingue*, *G. avellana*, *L. sempervirens* y ocasionalmente *N. glauca* y *Prumnopitys andina* (Poepp. Et Endl.) de Laub. en el estrato arbóreo, mientras que en los estratos intermedios de tipo arbustivo se encuentran *S. macrocarpa*, *L. dentata*. En estos bosques no se presenta una regeneración continua, existiendo frecuentemente un dosel superior coetáneo. Se distribuye en laderas occidentales de la cordillera de los Andes de la Región del Biobío entre los 800 y 1200 m (Luebert y Plissock, 2006).

1.2. Mortalidad en bosques de roble y raulí

En los bosques caducifolios entre las Regiones del Biobío y Los Ríos en que predominan especies de roble y raulí, durante los últimos 30 años se han estado observado síntomas en la copa semejantes a decaimiento, como también mortalidad de *N. dombeyi* en la Región de Aysén (González y Opazo, 2002). González (2008)¹ detectó en la Región de la Araucanía, árboles de *N. obliqua* con presencia de canchros con exudación de goma en el fuste y necrosis de raíces, junto con defoliaciones en la época estival. Desde los canchros se aisló una especie de *Phytophthora*, que posteriormente fue identificada como *Phytophthora pseudosyringae* (SAG, 2008), siendo la primera detección de esta especie en el país. Con los aislados obtenidos no se realizaron pruebas de patogenicidad para confirmar su rol en el desarrollo de canchros en *N. obliqua*.

¹ Comunicación personal, Gastón González (Biocaf, Chile)

En el año 2010, en un renoval dominado por *N. obliqua* localizado en la Cordillera de Nahuelbuta, Región del Biobío, se observaron árboles con síntomas similares a los descritos en La Araucanía, aislándose *P. cinnamomi* desde suelo rizosférico de árboles con síntomas en la copa. Durante el año 2013, investigadores del Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales, aislaron *P. pseudosyringae* desde suelo rizosférico de árboles sintomáticos y estudios siguientes demostraron la patogenicidad de este oomiceto en plantas de *N. alpina* y *N. obliqua* (Fajardo *et al.*, 2017).

De esta manera, en los casos de mortalidad en *N. obliqua* y *N. alpina* se han identificado al menos dos especies de *Phytophthora*. En un comienzo, la mortalidad de *Nothofagus* fue descrita como un posible caso de decaimiento, que correspondería a un problema de origen indeterminado de carácter natural o antropogénico (González y Opazo, 2002). Sin embargo, de acuerdo a los resultados previos, esta mortalidad en *Nothofagus* podría atribuirse a *P. pseudosyringae*; considerando que el patógeno fue aislado tanto desde suelo rizosférico y canchales en el fuste, y coincidiendo con los síntomas descritos en plantaciones de roble en UK afectadas por *P. pseudosyringae*, con los característicos canchales con gomosis en el fuste (Scanu *et al.*, 2015). Estas primeras evidencias permiten sugerir que es más preciso denominar este problema como “cancro gomoso de *Nothofagus*” (CGN).

La distribución y la intensidad del “cancro gomoso” son desconocidas en renovales *N. obliqua* y *N. alpina* tanto en el país como en la Región del Biobío, aunque las primeras observaciones de campo indican una baja incidencia en renovales con escasa actividad de manejo. Este comportamiento podría significar que *P. pseudosyringae* pudiese corresponder a una especie nativa en bosques de *Nothofagus* del centro sur de Chile (Fajardo *et al.*, 2015). Según Hansen (2008), patógenos nativos en una determinada región, no causan grandes disturbios a hospederos propios del lugar, debido a una co-evolución patógeno-hospedero, donde la susceptibilidad de los individuos nativos es baja y los patógenos forman parte del propio ciclo en el ecosistema. Se ha encontrado que especies de *Phytophthora* son relativamente abundantes en cursos de agua en bosques naturales sin generar problemas fitosanitarios (Hansen and Delatour 1999, Sutton and Hansen 2002, Hwang *et al.*, 2008, Greslebin *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 2002 y Sutton *et al.*, 2009) y que estas especies han sido pobremente

caracterizadas, con un estatus ecológico desconocido, pudiendo corresponder a especies nativas aún no identificadas. Contrariamente, Linzer *et al.* (2009) indican que *P. pseudosyringae* tendría su origen en Europa, lo que significaría que el patógeno podría haber sido introducido y estaría afectando a varios ecosistemas de bosques naturales, presentando un riesgo latente de bioseguridad para los bosques de *Nothofagus* en Gondwana (Scanu *et al.*, 2015).

1.3. Importancia de especies de *Phytophthora* y *P. pseudosyringae* en ambientes forestales

El género *Phytophthora* contiene aproximadamente 67 especies descritas (Erwin y Ribeiro, 1996) antes del 2000 y debido al incremento exponencial en el número de detecciones se cree que dentro de los próximos 50 años se identificarán a lo menos 200 nuevas especies (Kroon *et al.*, 2012). Las especies de *Phytophthora* se encuentran distribuidas en una amplia variedad de hábitats, tanto terrestres como acuáticos, y son capaces de causar diversos síntomas que van desde tizones foliares a pudriciones de raíces y cuello del árbol (Erwin y Ribeiro, 1996).

El interés por *Phytophthora* ha aumentado durante las últimas décadas, ya que numerosas especies de este género han sido asociadas al deterioro de bosques y la mortalidad de árboles en Europa (Brasier *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2000), como son la muerte repentina del roble (*Quercus* sp.) en América del Norte causada por *P. ramorum* (Rizzo *et al.*, 2002), mortalidad en bosques de *Chamaecyparis lawsoniana* afectados por *P. lateralis* en Oregón, Estados Unidos (Hansen and Hamm, 1996), el “Mal de Jarrah” afectando a *Eucalyptus marginata* en Australia provocado por *P. cinnamomi* (Weste y Marks, 1987), el mal de ciprés (*Austrocedrus chilensis*) en Argentina causado por *P. austrocedrae* (Greslebin, Hansen and Sutton, 2007), en Nueva Zelanda *P. pluvialis* provoca el “red needle cast” (Dick *et al.*, 2014), en Chile *P. pinifolia* afecta a *P. radiata* con el “Daño foliar del pino” (Duran *et al.*, 2008) y la muerte de roble (*N. obliqua*) en Inglaterra provocada por *P. pseudosyringae* (Scanu *et al.*, 2012) recientemente relatada en Chile (Fajardo *et al.*, 2015).

La especie *P. pseudosyringae* fue descrita el año 2003 como el agente causal de la pudrición de raíz y cuello de haya (*Fagus sylvatica*) y aliso (*Alnus glutinosa*) en Alemania, y detectada en suelos con especies forestales en Francia, Alemania e Italia (Jung *et al.*, 2003).

Actualmente, el rango de hospederos de *P. pseudosyringae* lo constituyen seis familias botánicas en Europa y Estados Unidos (Tabla 1). El patógeno causa canchros en haya y castaño (*Castanea sativa*) en Italia (Motta *et al.*, 2003; Scanu *et al.*, 2010), en viveros de castaño en España (Pintos Varela *et al.*, 2007) y en plantaciones de *N. obliqua* y *N. alpina* en Inglaterra (Scanu *et al.*, 2012). En estas especies de *Nothofagus* provoca defoliaciones, brotes epicórnicos asociados con agrietamiento de corteza y la muerte regresiva de ramas. En árboles maduros, gomosis asociados a canchros a lo largo del fuste (de 2 a 6 metros sobre el suelo). Otras especies como *N. alpina*, *Fagus sylvatica* y *Vaccinium myrtillus*, presentan muerte de ramas, necrosis foliar y muerte regresiva de copa (Scanu *et al.*, 2015).



TABLA 1. Hospederos de *Phytophthora pseudosyringae*, incluyendo aislados colectados desde suelo rizosférico

Nombre científico	Familia	Aislamiento	País (Región)	Referencia
<i>Acer macrophyllum</i> (Arce de hoja grande)	Aceraceae	Follaje	USA (California)	Wickland <i>et al.</i> , 2008
<i>Alnus glutinosa</i> (Aliso)		Cancros cuello Rizósfera	Alemania	Jung <i>et al.</i> , 2003
<i>Arctostaphylos</i> sp. (Manzanita)		Ramilla/hoja Follaje	California	Martin <i>et al.</i> , 2004 Wickland <i>et al.</i> , 2008
<i>Castanea sativa</i> (Castaño)	Fagaceae	Necrosis en cambium	España	Pintos Varela <i>et al.</i> , 2007
<i>Carpinus betulus</i> (Carpe blanco)	Betulaceae	Cancros en fuste y lesiones en la raíz	Gran Bretaña (Gales del sur)	Denman <i>et al.</i> , 2007
<i>Fagus sylvatica</i> (Haya)		Cancros en fuste y lesiones en la raíz	Gran Bretaña (Gales del sur)	Denman <i>et al.</i> , 2007
		Necrosis de raíces finas	Alemania	Jung <i>et al.</i> , 2003, Fleischmann <i>et al.</i> , 2004
		Cancros en cuello		
		Gomosis en la base del fuste	Italia	Motta <i>et al.</i> , 2003, Cacciola <i>et al.</i> , 2005, Linzer <i>et al.</i> , 2009

<i>Notholithocarpus densiflorus</i> (Roble moreno)	Fagaceae	Gomosis en base del fuste	California	Wickland <i>et al.</i> , 2008
<i>Malus pumila</i> (Manzano)	Rosaceae		Italia	Schena <i>et al.</i> , 2008
<i>Nothofagus alpina</i> (Raulí)	Nothofagaceae	Gomosis en base del fuste	Gran Bretaña (Cornwall)	Scanu <i>et al.</i> , 2012
<i>Nothofagus obliqua</i> (Roble)	Nothofagaceae	Gomosis en base del fuste	Gran Bretaña (Cornwall)	Scanu <i>et al.</i> , 2012
<i>Pieris floribunda</i> (Pieris)	Ericaceae		Gran Bretaña (Escocia)	Schlenzig 2010, comunicación personal
<i>Quercus agrifolia</i> (Encino)	Fagaceae	Cancros	California	Winckland <i>et al.</i> , 2008, Linzer <i>et al.</i> , 2009
<i>Quercus cerris</i> (Roble turco)	Fagaceae	Rizósfera	Italia	Jung <i>et al.</i> , 2003
<i>Quercus robur</i> (Roble ingles)		Rizósfera	Alemania y Francia	Jung <i>et al.</i> , 2003
		Rizósfera	Alemania	Linzer <i>et al.</i> , 2009
<i>Umbellularia californica</i> (Laurel de bahía)	Lauraceae	Ramillas y follaje	California	Winckland <i>et al.</i> , 2008
<i>Vaccinium myrtillus</i> (Arándano común)	Ericaceae	Cancros en tallo	Gran Bretaña (Cornwall)	Beales <i>et al.</i> , 2010

Fuente: Sansford, 2012

A diferencia del comportamiento observado en Europa, donde *P. pseudosyringae* se encuentra principalmente infectando raíces y fuste (porción basal), en la costa Oeste de USA el patógeno causa infecciones en follaje y ramillas de laurel de bahía (*Umbellularia californica*) y en otras especies forestales, y provoca canchros en fuste de roble moreno (*Notholithocarpus densiflorus*) y roble (*Quercus agrifolia*) (Wickland *et al.*, 2008).

1.4. Modelo epidemiológico de *P. ramorum* como base el estudio del ciclo de *P. pseudosyringae*

Son escasos los estudios relacionados con el ciclo de vida de *P. pseudosyringae* en bosques naturales en el mundo. De esta forma, parece adecuado utilizar el conocimiento epidemiológico disponible sobre especies de *Phytophthora* que poseen una fase aérea y que causan canchros en especies componentes de bosques o plantaciones, como modelo de estudio para ser aplicado en bosques de *Nothofagus*. En la selección del patosistema, se consideró de interés la asociación de *P. pseudosyringae* con *P. ramorum* (además de *P. nemorosa*) en la muerte repentina del roble (Sudden Oak Death – SOD) en bosque nativo de California (King *et al.*, 2015), para estudiar la asociación de *P. pseudosyringae* con especies arbóreas y arbustivas presentes en los bosques de *Nothofagus* en Chile, en que el patógeno pueda infectar y esporular, incrementando el inóculo para infectar *N. obliqua*, considerando esta especie equivalente a *Quercus* spp en ciclo del patógeno en California.

En California, *P. ramorum* se asocia a bosques mixtos de hoja perenne y secuoyas en zonas costeras (Rizzo *et al.*, 2005), donde el laurel de bahía (*Umbellularia californica*) y roble moreno (*Notholithocarpus densiflorus*) son los hospederos alternativos más relevantes en la muerte repentina del roble (Davidson *et al.*, 2005, 2008). Las hojas de laurel de bahía serían la principal fuente de inóculo del patógeno, causando pequeñas infecciones no letales que generan una abundante esporulación. Una función semejante es atribuida a roble moreno especie altamente susceptible a *P. ramorum*, esporulando el patógeno en ramillas, aunque menos que en laurel de bahía. En roble moreno y *Quercus* spp. el patógeno puede causar canchros en el fuste, que pueden ser letales, aunque no se ha constatado esporulación desde tales lesiones (Davidson *et al.*, 2005).

Una vez que las hojas de laurel de bahía generan el inóculo del patógeno, en forma de zoosporas, la dispersión es por acción del viento y lluvia alcanzando árboles y arbustos del sotobosque, propagando la enfermedad en los bosques mixtos de hoja perenne (Davidson *et al.*, 2011) y de secuías. En esta región, *P. pseudosyringae* y *P. nemorosa* tienen una distribución similar a *P. ramorum* y se encuentran causando los mismos síntomas. Estas dos especies, aunque no causan mortalidad en *Quercus* spp., pueden infectar especies del sotobosque, como *U. californica*, generando síntomas en hojas y ramillas similares a los provocados por *P. ramorum* (Martin and Tooley, 2003).

Otro aspecto en que pueden establecerse algunas relaciones entre ambos patosistemas, son las condiciones climáticas mediterráneas predominantes en California que son semejantes a las de la zona central en Chile, con veranos secos y templados e inviernos húmedo templados, condiciones en el oeste del continente entre los meridianos 30° y 40° de latitud (Lionello *et al.*, 2006).

Debido a los escasos estudios realizados en Chile sobre la mortalidad en bosques de *Nothofagus* asociada a *P. pseudosyringae*, es necesario conocer el ciclo de vida del patógeno y los factores que determinan el desarrollo de la enfermedad. En este contexto, se plantea determinar el rol de especies de la flora acompañante de *Nothofagus* spp. en el ciclo de *P. pseudosyringae*, lo que entregaría bases para elaborar estrategias de detección y manejo de la enfermedad.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El oomiceto *Phytophthora pseudosyringae* patógeno en las especies de *Nothofagus obliqua* (roble) y *N. alpina* (raulí), posee otros hospederos naturales o potenciales en especies arbóreas y arbustivas nativas acompañantes en bosques de roble y raulí del centro sur de Chile.

2.2. Objetivo general

Determinar los hospederos naturales y/o potenciales del oomiceto *Phytophthora pseudosyringae* en especies arbóreas y arbustivas nativas acompañantes del bosque de roble y raulí del centro sur de Chile.

2.3 Objetivos específicos

- Detectar bosques de roble y raulí en sectores con árboles y arbustos sintomáticos.
- Identificar las especies de *Phytophthora* asociadas a árboles y arbustos sintomáticos en bosques de roble y raulí.
- Determinar la patogenicidad de *Phytophthora pseudosyringae* en especies arbóreas y/o arbustivas acompañantes de bosques de roble y raulí.
- Determinar el potencial de esporulación de *Phytophthora pseudosyringae* en especies acompañantes en los bosques de roble y raulí.

III. METODOLOGÍA

3.1 Lugares de muestreo

El estudio fue realizado en dos localidades de la Región del Biobío: (a) Espigado en la Comuna de Santa Juana, Cordillera de Nahuelbuta, (b) Santa Bárbara, Precordillera de Los Andes. Los predios poseen rodales de roble, en que se había verificado previamente gomosis en fustes, defoliación y muerte de algunos ejemplares. Los rodales fueron muestreados durante el año 2016 en distintas temporadas.

El sector Espigado posee un renoval con predominio de *N. obliqua*, acompañados por *N. alpina*, *P. lingue*, *A. chilensis*, *C. alba* y sotobosque con *S. macrocarpa*. En este renoval se describió por primera vez la ocurrencia del patógeno en la Región del Biobío (Fajardo *et al.*, 2015). El suelo posee textura franco arcilloso arenoso, y es de tipo orgánico (Caripan y Gomez, 2003).

El sector Santa Bárbara posee un renoval compuesto por *N. obliqua*, acompañado de *P. lingue*, *C. alba*, *L. apiculata*, *L. hirsuta*, y en el sotobosque destaca por su abundancia *S. macrocarpa*. El rodal presenta tránsito frecuente de animales y personas, y se encuentra cercano a un camino. El suelo posee una cubierta de materia orgánica, con textura franco limosa y buen drenaje (Martínez 2004). Posee un clima mediterráneo pluviestacional (Luebert y Pliscoff, 2006)

3.2 Colecta de muestras y aislamientos de *Phytophthora*

3.2.1 Aislamiento desde árboles de *Nothofagus*

En ambos sectores, el muestreo se realizó en primavera-verano y otoño-invierno del año 2016, seleccionándose cinco árboles de *N. obliqua* que presentaban síntomas como defoliación y gomosis en el fuste. Desde cada árbol, fue obtenida una muestra de tejido de floema y leño desde la zona de avance del cancro (5x5x5 cm). Las muestras fueron puestas en agua destilada estéril, mantenidas en frío y transportadas a Laboratorio de Patología Forestal (LPF) de la Facultad de Ciencias Forestales. Trozos de las muestras fueron desinfectadas superficialmente (alcohol etílico 70° por 3 min, triple lavado en agua destilada estéril (ADE) y sembrados en medio selectivo Agar-V8-PARPNH (agar-V8 no clarificado adicionado con 10 µg ml⁻¹

pimaricina, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicilina, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rifampicina, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pentacloronitrobenzeno (PCNB) y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ himexazol) (Jung *et al.*, 2003). El micelio obtenido, luego de cuatro días creciendo a 20°C, se transfirió a agar zanahoria (AZ) y a agar-V8 (AV8) para su crecimiento y caracterización (Rizzo *et al.*, 2002; Scanu *et al.*, 2012).

3.2.2 Aislamiento desde follaje de especies acompañantes

Empleando como referencia árboles de *N. obliqua* con síntomas del cancro gomoso, en un radio de 25 m desde cada ejemplar fueron colectadas muestras de especies arbóreas y arbustivas acompañantes que presentaran necrosis foliar similar a las descritas para *Phytophthora* spp., junto con coleccionar hojas asintomáticas desde las especies acompañantes. Las hojas fueron dispuestas en bolsas humedecidas con agua destilada estéril, mantenidas en frío y transportadas a Laboratorio de Patología Forestal (LPF). Los muestreos fueron realizados en dos épocas del año: primavera-verano y otoño-invierno. El procedimiento de aislamiento fue el descrito para *Nothofagus* spp. (5.2.1).

3.3 Identificación de las especies de *Phytophthora*

3.3.1 Identificación morfológica

La identificación de especies de *Phytophthora* se realizó siguiendo las claves de Waterhouse (1963), Waterhouse *et al.*, 1983; Stamp *et al.*, (1990); Erwin y Ribeiro (1996), Drenth y Sendal (2001), Gallegly y Hong (2008) y Lamour (2013). Los aislados estuvieron creciendo durante una semana en AZ a 20°C, posteriormente, discos de micelio con crecimiento activo fueron dispuestos en extracto de suelo (Jung *et al.*, 2003) para observar la formación de estructuras asexuales, luego de 48-72 h.

3.3.2 Identificación molecular:

A partir de colonias creciendo durante una semana en AZ o AV8 se colectó micelio (aproximadamente 100 mg), para luego realizar la extracción de ADN con el "kit" comercial "GeneJet Genomic DNA Purification Kit" (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ADNg se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBRsafe, a 80 volts durante 10 min, cargando 3 μL de muestra con 1 μL de buffer de carga 6x. La concentración y pureza de las muestras se determinó

comparando las muestras contra un estándar de ADN Lambda, se cargaron 2 μL del estándar (concentración 20 ng/ μL). Se utilizaron las muestras que cumplan con la pureza y concentración esperadas.

La reacción de PCR consistió en 1.25 μL buffer de PCR 10x, 0,4 μL de MgCl_2 (50mM), 0,25 μL dNTPs (10mM), 0,375 μL de cebadores específicos 10 μM , 0,1 μL Taq ADN polimerasa Lifetech (5U/ μL), 1 μL de ADN (1ng/ μL) y agua libre de nucleasas para aplicaciones de biología molecular. El volumen total de la reacción fue de 12 μL . El programa de temperatura de PCR consistió en una etapa de desnaturalización de 5 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 95°C, hibridación de 30s a 58-60°C (dependiendo de la T_m de partidor F y R usados en la reacción) y 1 min de extensión a 72°C, por último, una etapa de extensión de 10 min a 72°C (Modificado de Schena *et al.*, 2008). Se visualizó el producto de reacción en gel de Agarosa a 2%, teñido con SYBRsafe, cargando 5 μL de muestra y 1 μL de Buffer de carga 6X. Se llevó a cabo la electroforesis a 90 volt por 30 min y se utilizaron 2 μL del marcador de peso molecular 1 Kb.

Para la identificación a nivel de género se utilizaron el par de partidores Yph1F e Yph2R (Schena *et al.*, 2008), con un producto de PCR esperado de 470 pb. Luego, se utilizaron partidores especie – específicos para *P. pseudosyringae*, usando un par de partidores Ypse1F e Ypse2R (Schena *et al.*, 2008), con un producto de PCR esperado de 205 pb.

3.4 Pruebas de patogenicidad

Se seleccionaron dos aislados identificados previamente como *P. pseudosyringae*, los cuales fueron utilizados en la inoculación de las especies acompañantes de mayor frecuencia en los rodales en estudio.

3.4.1 Inoculaciones de *P. pseudosyringae* en especies acompañantes

3.4.1.1 Inoculación en tallo

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en ocho especies arbóreas y arbustivas acompañante de bosques de roble y raulí (Tabla 2), basado en la metodología descrita por Hansen (2005). Fueron utilizadas plantas obtenidas desde un vivero comercial (Forestal Arauco), las que tenían una altura entre 10-94 cm dependiendo de la especie. Las plantas

fueron mantenidas durante dos semanas en aclimatación dentro del invernadero de la Facultad de Ciencias Forestales. Las plantas fueron inoculadas con dos aislados de *P. pseudosyringae* (E1 y R6), colectados desde las localidades de Espigado y Santa Bárbara, respectivamente. El inóculo del patógeno correspondió a discos de micelio, obtenido desde colonias creciendo activamente en medio AZ, durante siete días en oscuridad a 20°C. La inoculación consistió en retirar una porción de la corteza a la altura del cuello de la planta, para disponer un disco de micelio del aislado del patógeno, sellándose el área inoculada con Parafilm®. En las plantas control se utilizó un disco de AZ estéril. El ensayo fue conducido en un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento (especie) y la unidad experimental consistió en la planta. Después de la inoculación las plantas fueron mantenidas durante cuatro semanas en el invernadero de la Facultad de Ciencias Forestales, con riego diario y temperatura controlada de 25°C. Luego de las cuatro semanas, fue evaluada la longitud de lesión en tallo y la mortalidad de plantas. Desde las lesiones formadas en tallo se realizaron re-aislamientos en medio selectivo Agar-V8-PARP(PH).

Se realizó un análisis de homogeneidad de varianza mediante ANOVA y posteriormente se aplicó un test de diferencia mínima significativa de Fisher con nivel de significancia de $P=0.05$ mediante el uso del software Infostat.

TABLA. 2. Especies arbóreas y arbustivas del tipo de bosque roble raulí inoculadas con aislados de *Phytophthora pseudosyringae*

Nombre común	Nombre científico	Tipo de vegetación	Tipo de hoja
Roble	<i>Nothofagus obliqua</i>	Arbórea	Caduca
Coihue	<i>Nothofagus dombeyi</i>	Arbórea	Perenne
Peumo	<i>Cryptocarya alba</i>	Arbórea	Perenne
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	Arbórea	Perenne
Lingue	<i>Persea lingue</i>	Arbórea	Perenne
Mayu	<i>Sophora macrocarpa</i>	Arbustiva	Perenne
Olivillo	<i>Aextoxicon semipunctatum</i>	Arbórea	Perenne
Laurel	<i>Laurelia sempervirens</i>	Arbórea	Perenne

Fuente: Elaboración propia.

3.4.1.2 Inoculación en hojas

Fueron utilizadas las mismas especies acompañantes descritas para las inoculaciones en tallo (Tabla 2), empleándose en este caso una mezcla de los dos aislados de *P. pseudosyringae* (E1 y R6). El inóculo del patógeno, constituido por zoosporas, fue obtenido desde cultivos en AZ, durante siete días a 20°C. Después de la incubación se obtuvieron discos de micelio desde la colonia, de 1 cm de diámetro, y fueron dispuestos en placas de Petri con agua destilada estéril durante 72 h. Una vez que ocurrió la formación de esporangios en los discos de micelio, las placas fueron mantenidas a 4°C durante 1 h y luego a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C, para la liberación de las zoosporas. La concentración de zoosporas empleada en la inoculaciones fue de 1×10^5 zoosporas/ml (Scanu *et al.*, 2015).

La inoculación consistió en sumergir tres hojas por planta en la suspensión de zoosporas del patógeno durante 2 h, y luego mantenidas 72 h en cámara húmeda. Después de la inoculación, las plantas fueron mantenidas dos semanas a 25°C, con riego diario por aspersión con ADE. En las plantas control, las hojas fueron sumergidas en ADE. Después de 7 y 14 días, se evaluó la necrosis del tejido foliar mediante caracterización visual. La patogenicidad fue confirmada mediante el re-aislamiento desde los tejidos necrosados de las hojas en medio selectivo Agar-V8-PAR(PH).

3.5 Potencial de esporulación de *P. pseudosyringae* en especies acompañantes

El potencial de esporulación consistió en la inoculación de hojas en condiciones *in vitro*, empleándose ocho especies de la flora acompañante (Tabla 2). La producción de inóculo del patógeno fue semejante a la descrita en 3.4.1.2, reemplazando el ADE con extracto de suelo (50 g de suelo en 1000 ml⁻¹ de ADE) (Jung *et al.*, 2003). Fueron inoculados una mezcla de aislados de *P. pseudosyringae* (E1 y R6), a una concentración de 1x10⁵ zoosporas/ml, cuantificada mediante hematocitómetro (Scanu *et al.*, 2015).

Las plantas fueron inoculadas por microgota, aplicando 50 µL de la suspensión de zoosporas del patógeno en el centro de una zona marcada en la región apical de la hoja seleccionada (1 cm²) (modificado Johnston 2015). Para cada especie, fueron colectadas cuatro hojas por planta, siendo inoculadas dos hojas en el haz y dos en el envés, para un total de tres plantas. La suspensión de zoosporas se mantuvo durante 24 h en contacto directo con la hoja, luego las hojas fueron mantenidas en cámara húmeda durante cinco días a 20°C en condiciones 8/16 h de día/noche. El control consistió en una microgota de ADE. A continuación, en la zona inoculada de la hoja se cortó un disco de 1 cm² de diámetro y se dispuso en portaobjeto, agregando una gota de calcoflúor. Mediante microscopio óptico con fluorescencia por luz UV (Axio Scope A1), se cuantificó el número de esporangios en la zona de inoculación. Se procedió a realizar aislamientos para confirmar la presencia de *P. pseudosyringae* desde los puntos de inoculación en medio selectivo Agar-V8-PAR(PH). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilks, y se realizó un análisis de homogeneidad de varianza, para ser analizados mediante ANOVA y test de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia de P=0.05, con el auxilio del software Infostat.

IV. RESULTADOS

4.1 Colecta de muestras y aislamiento.

El sector muestreado del rodal en Santa Bárbara tenía alrededor de 50 árboles de *N. obliqua*, con 15 a 20 m de altura y DAP de 15- 20 cm, observándose canchros en al menos doce árboles, a distintas alturas y frecuencia en el fuste (Figura 1). En este rodal se obtuvieron seis aislados de *P. pseudosyringae* desde canchros en fuste de roble. En las especies acompañantes del rodal: *P. lingue*, *S. macrocarpa*, *C. alba*, *L. hirsuta* y *L. sempervirens*, se colectaron hojas con síntomas, principalmente manchas foliares, pero no fue aislado *Phytophthora* spp.



FIGURA 1. Árboles de *Nothofagus obliqua* con síntomas del cancro gomoso (CGN) en Santa Bárbara. Defoliación (a), canchros con gомosis (b) y necrosis subcortical (c).

Fuente: Elaboración propia.

En el rodal de Espigado tenía registros previos de defoliaciones y presencia de cancro gomoso en fuste de roble (Figura 2). En el rodal se observaron árboles de lingue con canchros que presentaban abundante exudación de goma (Figura 3), aunque no fue aislado *P. pseudosyringae*

En plantas de regeneración de lingue se observaron hojas apicales con síntomas tipo tizón aislándose *P. pseudosyringae* (Figura 3c). Árboles adultos de lingue, peumo, boldo y raulí presentaron síntomas similares a los descritos para patologías causadas por *Phytophthora* spp., sin embargo, no se obtuvieron aislados de oomicetos. Por otro lado, desde un sector de aproximadamente 2 m de diámetro, los árboles de roble y lingue que lo componían presentaban defoliación, aunque sin cancro gomoso, y desde el suelo rizosférico se aisló *P. cinnamomi*.



FIGURA 2. Síntomas en árboles de *Nothofagus obliqua* en sector de Espigado. Defoliación (a), exudación de goma en el fuste (b) y (c).

Fuente: Elaboración propia.



FIGURA 3. Síntomas observados en *Persea lingue* en predio Espigado. Defoliación (a) y cancro con exudación de goma en árboles adultos (b) y tizón apical en regeneración (c). Fuente: Elaboración propia.

4.2 Identificación de las especies de *Phytophthora*

En el sector de Alto Biobío, entre los 12 árboles de roble con cancro en fuste, seis presentaban *Phytophthora*, de acuerdo a características morfológicas y moleculares, mientras que entre las especies acompañantes que presentaban lesiones foliares no se aisló *Phytophthora*. En Espigado, en los cuatro árboles de lingue con cancro gomoso no se obtuvieron aislados de *Phytophthora*, encontrándose frecuentemente otros hongos, principalmente *Pestalotiopsis* spp. Desde las hojas con necrosis, solo desde la que presentaba un tipo de tizón foliar en una planta juvenil de lingue correspondió a *Phytophthora*.

Un total de siete aislados de *Phytophthora* spp. fueron obtenidos desde distintos tejidos en campo (Tabla 3). Los aislados creciendo en medio AZ presentaron colonias de tipo petaloide-estrellada.

TABLA 3. Aislados de *Phytophthora pseudosyringae* obtenidos desde tejido sintomático, colectados desde dos sectores de la Región del Biobío.

Aislado	Sector	Fecha colecta	Hospedero	Síntoma
Agua Santa 1	Santa Bárbara	Junio	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Ralco 1	Santa Bárbara	Febrero	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Ralco 2	Santa Bárbara	Febrero	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Ralco 6	Santa Bárbara	Julio	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Ralco 9	Santa Bárbara	Julio	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Ralco 11	Santa Bárbara	Julio	<i>N. obliqua</i>	Cancro
Espigado 1	Espigado	Mayo	<i>P. lingue</i>	Necrosis foliar

Fuente: Elaboración propia.

Los aislados de *Phytophthora* obtenidos fueron homotáticos, con formación de estructuras sexuales, oogonio plerótico y anteridio parágino (Figura 4). En extracto de suelo formaron esporangios semi-papilados, en su mayoría no caducos, con pedicelo corto, con forma desde ovoide a elipsoide. Los esporangios midieron 49,17 x 32,70 μm (LxA) (Tabla 4). Basado en la morfología y dimensiones de las estructuras sexuales y asexuales comparado con lo reportado por Jung *et al.* (2003), donde el rango de tamaño específico de esporangios corresponde (20 – 98) x (15 – 48) (LxA) y la media de 48x30 (LxA). Todos los aislados colectados desde canchales y hojas correspondieron a *P. pseudosyringae*

TABLA 4. Dimensión (μm) de estructuras asexuales, esporangios (30) de aislados de *Phytophthora pseudosyringae*

Aislado	Rango (LxA)	Media LxA
Agua Santa 1	(35,35 - 70,94) x (21,96 - 40,44)	55,19 x 33,94
Ralco 1	(36,60 - 55,84) x (28,60 - 40,95)	41,00 x 33,32
Ralco 2	(28,73 - 64,27) x (25,24 - 39,67)	46,46 x 31,96
Ralco 6	(40,79 - 67,63) x (32,34 - 42,81)	53,07 x 37,95
Ralco 9	(20,05 - 66,85) x (10,85 - 41,76)	51,96 x 28,99
Ralco 11	(22,57 - 49,97) x (16,09 - 36,34)	39,69 x 28,83
Espigado 1	(47,31 - 71,62) x (27,12 - 38,45)	56,81 x 33,89

Fuente: Elaboración propia.

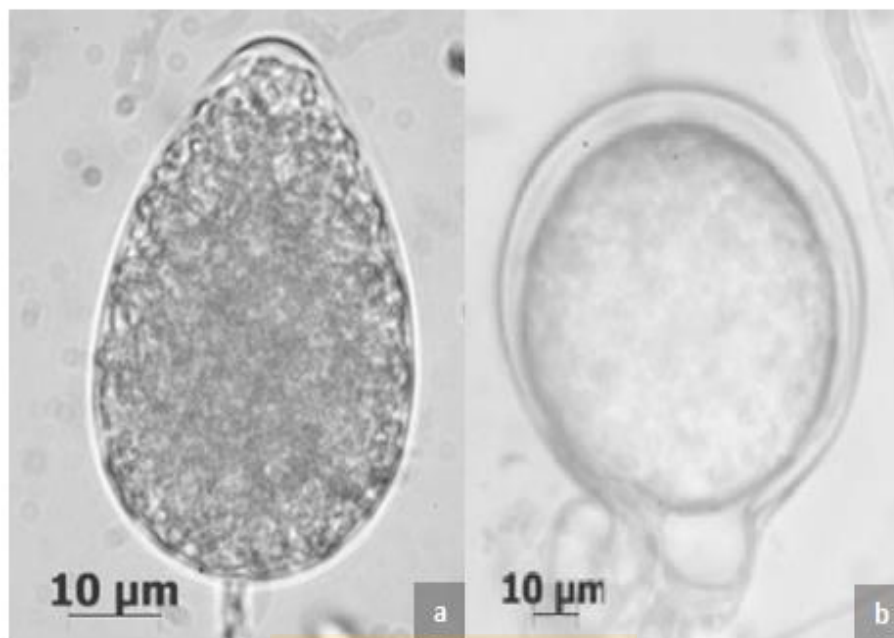


FIGURA 4. Estructura asexual (esporangio) (A) y sexual (oogonio y anteridio) (B) de aislados de *Phytophthora pseudosyringae*.

Fuente: Elaboración propia.

Para corroborar la identidad de los siete aislados, previamente identificados como *Phytophthora* spp. por sus características morfológicas (Tabla 4), se utilizaron partidores para género y especie. Todos los aislados amplificaron fragmentos de aproximadamente 400 pb comprobando que corresponden al género *Phytophthora*, y los fragmentos anidados sobre esa región fueron de aproximadamente 210 pb, todos correspondieron a la especie *P. pseudosyringae* conforme a lo descrito por Schena *et al.* (2008).

4.3 Ensayos de patogenicidad

4.3.1 Inoculación en tallo

Los primeros síntomas observados fueron leve marchitamiento foliar en la primera semana post inoculación; en tres plantas de *P. lingue*, dos de *N. obliqua* y una de *N. dombeyi*. En la segunda semana, todas las plántulas de *P. lingue* (Figura 5) y *N. dombeyi* inoculadas presentaron síntomas de marchitamiento, además en las plantas *N. obliqua* ocurrió una pérdida de las hojas basales. Durante la tercera semana, los síntomas continuaron intensificando en las plantas de las tres especies y en la última semana todas las plantas que estaban con marchitamiento presentaban necrosis completa de la planta.

La mortalidad de las tres especies, *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *P. lingue* varió entre 20-40% (Tabla 5). Las plantas control no presentaron síntomas durante el ensayo.

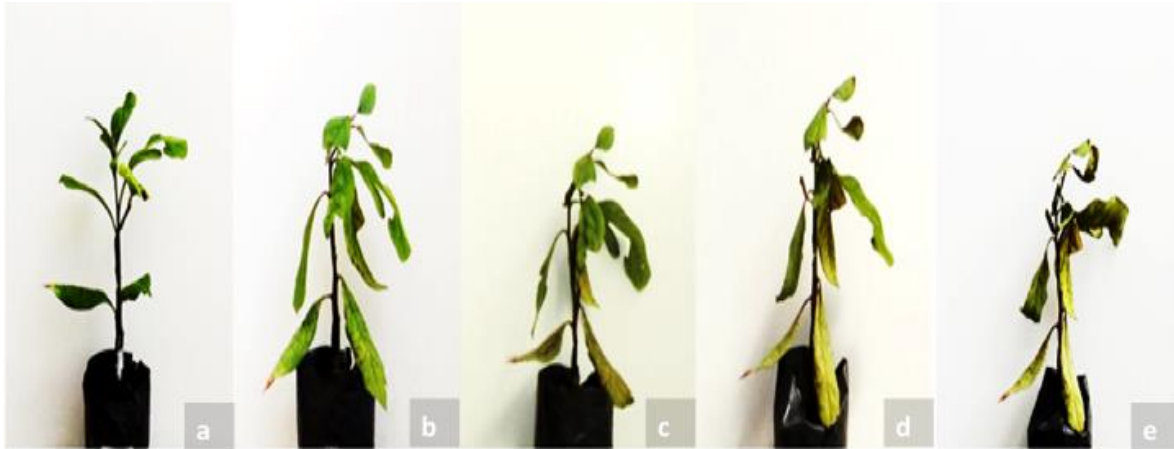


FIGURA 5. Evolución de síntomas en plantas de *Persea lingue* inoculadas con *Phytophthora pseudosyringae* aislado Espigado 1. a) Planta antes de la inoculación, b) marchitez foliar incipiente en la primera semana, c) marchitamiento y decoloración en la semana dos, d) inicio de necrosis en la tercera semana y e) necrosis foliar en la cuarta semana.

Fuente: Elaboración propia.

Además marchitamiento y necrosis foliar, *P. pseudosyringae* (R6 y E1) provocó necrosis en la zona del cuello de las plantas de *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *P. lingue*. Después de 30 días post inoculación, la longitud de lesión varió entre 15-20 mm (Figura 6). En plantas de *L. sempervirens*, *A. punctatum*, *P. boldus* y *S. macrocarpa*, en la zona de inoculación solo se observó a una oxidación del xilema y no se produjeron síntomas en la parte aérea. La única especie que no presentó síntomas en hojas o tallo fue *C. alba*

En el proceso de re-aislamiento de *P. pseudosyringae* desde los tejidos necrosados, próximos al punto de inoculación, se obtuvo una frecuencia cercana al 100% en las especies sintomáticas (Tabla 5), como también se aisló en alta proporción desde plantas de *A. punctatum* que no presentaron síntomas en la parte aérea durante el período del ensayo. Desde algunas plantas que no presentaron desarrollo de lesión por *P. pseudosyringae* se aislaron otros tipos de hongos, como por ejemplo, desde el sitio de inoculación en *S. macrocarpa* fue aislado *Fusarium* sp. Desde las plantas control no se aisló *P. pseudosyringae*.

TABLA 5. Síntomas en follaje, ocurrencia de cancro (C), mortalidad (M%) y re-aislamiento (+) desde el cuello de especies arbóreas y arbustivas inoculadas con dos aislados de *Phytophthora pseudosyringae*: Espigado 1 (E1) y Ralco 6 (R6).

Especie	Síntomas en follaje	E1			R6		
		C	M (%)	(+)	C	M (%)	(+)
<i>Nothofagus obliqua</i>	Marchitez y necrosis	5/5	40	5/5	5/5	40	5/5
<i>Nothofagus dombeyi</i>	Marchitez y necrosis	5/5	20	5/5	3/5	20	5/5
<i>Laurelia sempervirens</i>	-	0/5	-	0/5	0/5	-	0/5
<i>Sophora macrocarpa</i>	-	0/5	-	0/5	0/5	-	0/5
<i>Aextoxicon punctatum</i>	-	0/5	-	3/5	0/5	-	5/5
<i>Cryptocarya alba</i>	-	0/5	-	0/5	0/5	-	0/5
<i>Persea lingue</i>	Marchitez y necrosis	5/5	20	3/5	5/5	40	4/5
<i>Peumus boldus</i>	-	0/5	-	0/5	0/5	-	0/5

Fuente: Elaboración propia.

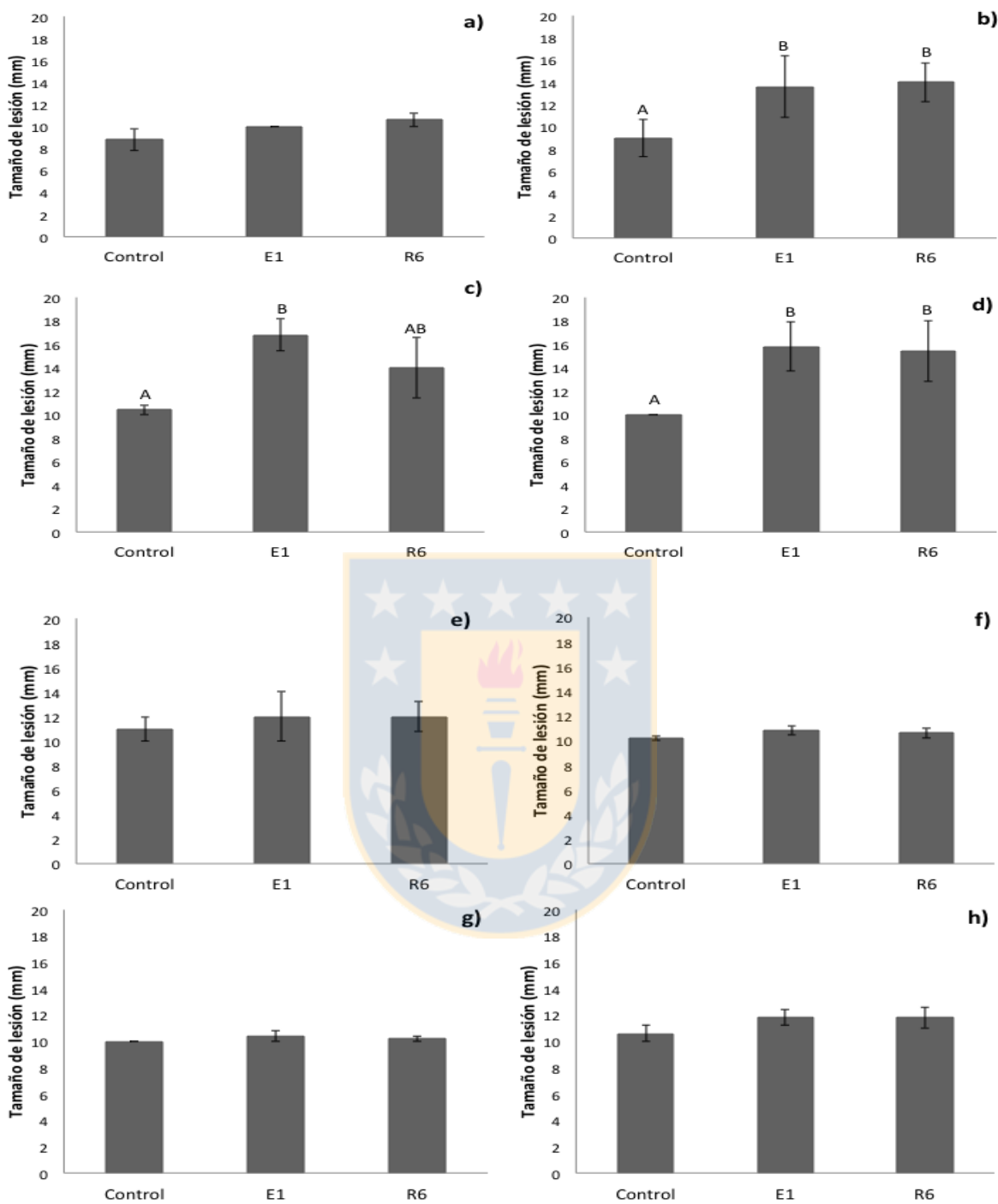


FIGURA 6. Longitud de lesión en tallos de plantas de especies del tipo de bosque roble raulí inoculadas con aislados de *Phytophthora pseudosyringae*, Espigado 1 (E1) y Ralco 6 (R6). a) *Laurelia semprevirens*, b) *Nothofagus obliqua*, c) *Nothofagus dombeyi*, d) *Persea lingue*, e) *Aextoxicon semipunctatum*, f) *Cryptocarya alba*, g) *Peumus boldus* y h) *Sophora macrocarpa*.

Fuente: Elaboración propia.

4.3.2 Inoculación en hojas

Las plantas de *N. obliqua* presentaron los primeros síntomas después de 72 h de la inoculación, que correspondieron a pequeñas lesiones necróticas, y después de una semana las lesiones necróticas se unieron formando una lesión de mayor tamaño. En la segunda semana, una planta presentaba las hojas con extensa necrosis y dos plantas con abundante formación de pequeñas lesiones necróticas, seguido de un amarillamiento de las hojas en la segunda semana (Figura 7a). Síntomas similares se observaron en las plantas de *N. dombeyi* en la segunda semana, aunque con menor cantidad lesiones y sin amarillamiento.

En las plantas de *P. lingue*, se formaron pequeñas lesiones necróticas luego de 48 h (Figura 7b) y después de dos semanas, las lesiones foliares aumentaron su mayor tamaño debido a la coalescencia de lesiones, entretanto en algunas lesiones permanecieron sin variaciones y se formó un pequeño halo clorótico.

Manchas foliares de pequeño tamaño se formaron en plantas de *C. alba* (Figura 7c), algunas de las cuales también presentaron un halo clorótico en torno las manchas. En las plantas de *P. boldus*, se formaron pequeñas lesiones necróticas en zonas de la hoja con heridas producto de daño mecánico, generadas en el proceso de inoculación.

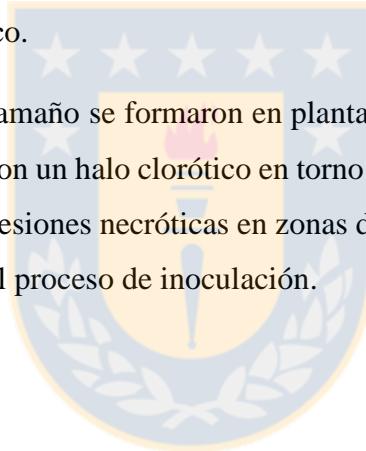




FIGURA 7. Síntomas en hojas luego de una y dos semanas post inoculación con suspensión de zoosporas de *Phytophthora pseudosyringae* en cuatro especies nativas. *Nothofagus obliqua* (a), *Persea lingue* (b), *Cryptocarya alba* (c) y *Nothofagus dombeyi* (d). De izquierda a derecha: semana 1 y semana 2.

Fuente: Elaboración propia.

Las otras especies inoculadas, *S. macrocarpa*, *A. punctatum* y *L. sempervirens*, y el total de las plantas control de las especies no presentaron síntomas foliares durante el período de ensayo.

Desde los re-aislamientos se obtuvo una menor frecuencia de *P. pseudosyringae* (Tabla 6) comparado con los resultados de canchros en ensayos de inoculación en tallo. Desde todas las plantas que presentaron síntomas foliares se aisló *P. pseudosyringae* entretanto, desde las plantas inoculadas que no desarrollaron síntomas y en las hojas de las plantas control no se aisló el patógeno.

Tabla 6. Síntomas foliares en especies acompañantes inoculadas con suspensión de zoosporas de *Phytophthora pseudosyringae*

Especie	Síntomas	Control	Inoculado
<i>Nothofagus obliqua</i>	Mancha foliar coalescente	0/5	5/5
<i>Nothofagus dombeyi</i>	Mancha foliar coalescente	0/5	1/5
<i>Laurelia sempervirens</i>	-	0/5	0/5
<i>Sophora macrocarpa</i>	-	0/5	0/5
<i>Aextoxicon punctatum</i>	-	0/5	0/5
<i>Cryptocarya alba</i>	Mancha foliar discreta	0/5	2/5
<i>Persea lingue</i>	Mancha foliar coalescente y discreta	0/5	2/5
<i>Peumus boldus</i>	Mancha foliar discreta	0/5	2/5

Fuente: Elaboración propia.

4.4 Potencial de esporulación en hojas

Las hojas de *P. boldus*, *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *P. lingue* y *C. alba* presentaron necrosis en los puntos de inoculación (Figura 8), y en *P. lingue* y *C. alba* los síntomas fueron observados solo en la inoculación realizada en el envés de las hojas. Las otras especies inoculadas no presentaron síntomas foliares. Se observó formación de esporangios en la mayoría de las especies que presentaron necrosis en el envés de las hojas (Figuras 9 y 10). Entretanto, *S. macrocarpa* aunque no presentó síntomas foliares, se generaron una mayor cantidad de esporangios en el haz de la hoja (17 esporangios promedio).

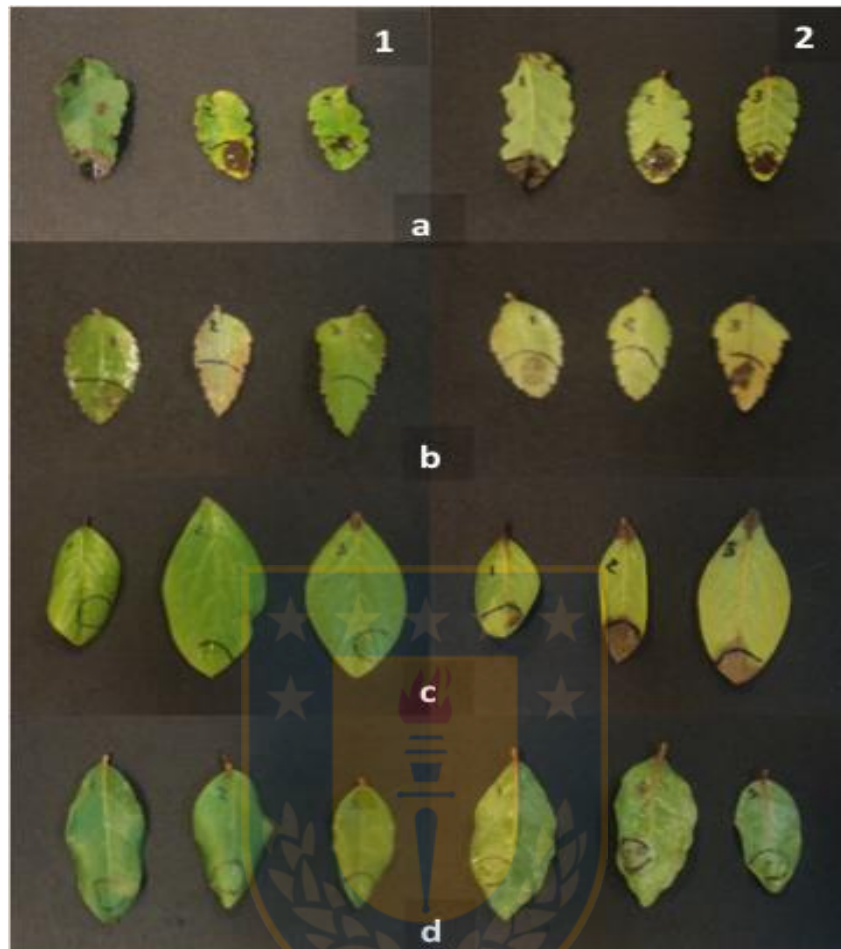


FIGURA 8. Síntomas en hojas inoculadas con *Phytophthora pseudosyringae*. *Nothofagus obliqua* (a), *N. dombeyi* (b), *Persea lingue* (c) y *Cryptocarya alba* (d). De izquierda a derecha, inoculado en haz y envés.

Fuente: Elaboración propia.

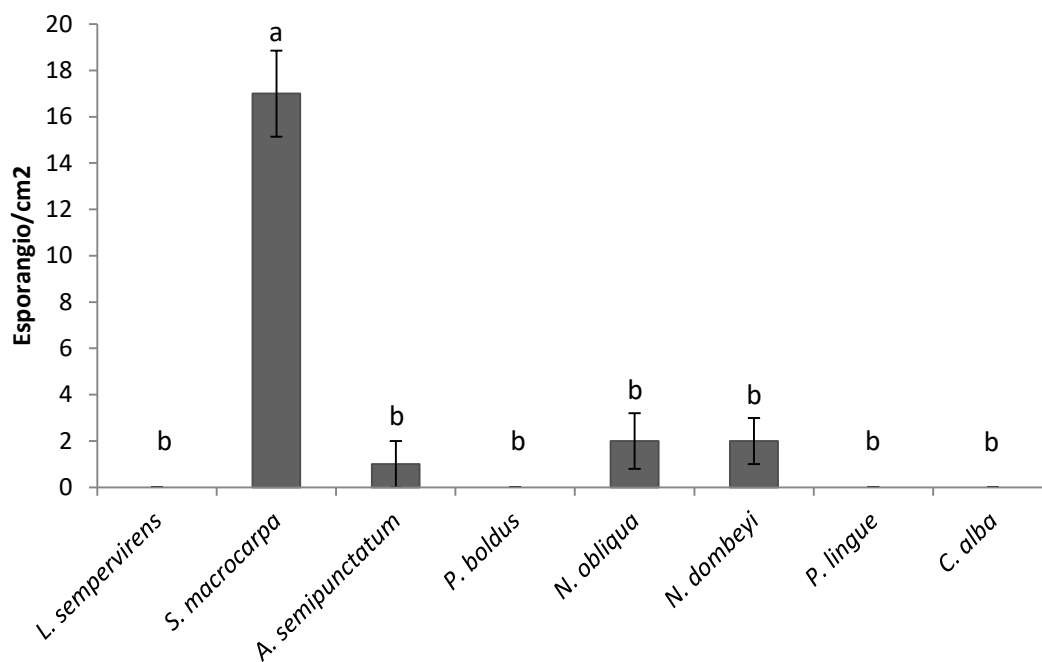


FIGURA 9. Número de esporangios formados en el haz de hoja inoculadas con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora pseudosyringae*. Letras sobre barras indican diferencias significativas.

Fuente: Elaboración propia.

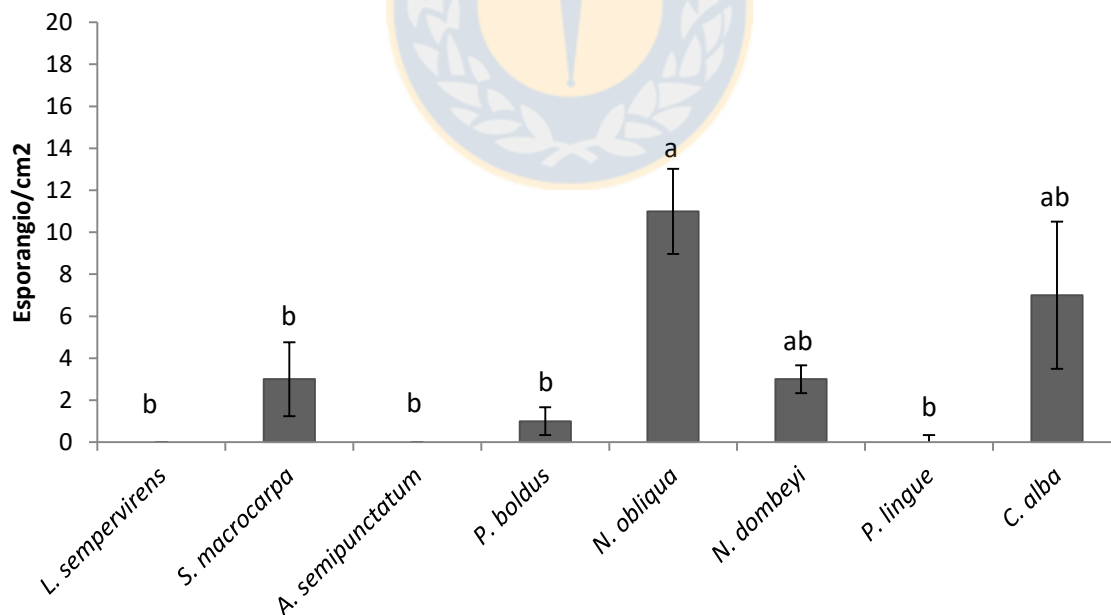


FIGURA 10. Número de esporangios de *Phytophthora pseudosyringae* (1 cm^2) formados en el envés de hojas inoculadas con una suspensión de zoosporas del patógeno. Letras sobre barras indican diferencias significativas.

Fuente: Elaboración propia.

Desde los re-aislamientos se obtuvo *P. pseudosyringae* en todas las especies en estudio, tanto sintomáticas como asintomáticas, con o sin presencia de esporangios en las hojas. Las hojas control no presentaron síntomas, como tampoco formación de esporangios en la zona de inoculación y no se aisló *P. pseudosyringae*.

Considerando los ensayos realizados con las especies nativas acompañantes, las especies, *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *C. alba* fueron susceptibles al patógeno, desarrollándose canchros en tallo y necrosis foliar (Tabla 7). Entre tanto, en las condiciones de ensayo *A. punctatum* y *L. sempervirens* resultaron ser especies no hospederas.

TABLA 7. Efecto de la inoculación de *Phytophthora pseudosyringae* en tallos y hojas de ocho especies del bosques de roble y raulí.

Especie	Canchros en tallo	Necrosis en hojas	Esporulación en hojas
<i>Nothofagus obliqua</i>	X	X	X
<i>Nothofagus dombeyi</i>	X	X	X
<i>Laurelia sempervirens</i>			
<i>Sophora macrocarpa</i>			X
<i>Aextoxicon punctatum</i>			
<i>Cryptocarya alba</i>		X	X
<i>Persea lingue</i>	X	X	
<i>Peumus boldus</i>		X	

Fuente: Elaboración propia.

V. DISCUSION

Phytophthora pseudosyringae ha sido descrito como un patógeno con capacidad de infectar raíces, tejido cortical (Jung *et al.*, 2003) y tejido foliar (Scanu *et al.*, 2015), dependiendo de la especie y susceptibilidad del hospedero. Algunas especies son susceptibles a la infección de un órgano específico, como en el caso de canchros; mientras otras especies que son altamente susceptibles al patógeno, pueden desarrollar lesiones en más de un órgano, como infecciones foliares y canchros. Este tipo de comportamiento ocurre con *P. ramorum* afectando al roble moreno en USA (Parke *et al.*, 2007) y *P. lateralis* en *Chamaecyparis lawsoniana* en Inglaterra (Green *et al.*, 2013), en los que el patógeno provoca infecciones en raíz (o cuello) y tejido foliar. En el caso de *P. pseudosyringae* se ha demostrado la capacidad del patógeno para causar infecciones en plantaciones de roble en Inglaterra en la parte aérea y raíces (Scanu *et al.*, 2015). El patógeno en *N. obliqua* provoca extensas lesiones en fuste con exudación de goma, necrosis foliar y canchros de ramillas o ramas completas que terminaban causando la muerte total o parcial de la copa en individuos juveniles.

Existe solo un registro previo de *P. pseudosyringae* afectando especies nativas en Chile (Fajardo *et al.*, 2017), quienes reportaron el cancro gomoso (CGN) en *N. obliqua* en un sector de la Cordillera de Nahuelbuta, confirmado en este estudio, junto con una nueva detección del patógeno en la Precordillera de Los Andes, también en la Región del Bío-bío, donde la sintomatología está restringida a sectores de bosque nativo poco transitados, y en los cuales pocos árboles presentan un mayor nivel de severidad.

En estudios previos realizados por Fajardo *et al.* (2017) se realizaron aislamientos directamente desde la rizósfera y asociaron a *P. pseudosyringae* a un patógeno de suelo, tal como había sido descrito en una primera detección por Jung *et al.* (2003). En la mayoría de los casos, bajo condiciones ambientales estables *Phytophthora* típicamente de suelo se encuentran restringidas a las raíces finas de los árboles, las cuales son remplazadas sin causar una disminución importante en el crecimiento de los árboles (Hansen 2008). Cuando las condiciones ambientales varían, se desencadenan estados de estrés que ocasionan un incremento en la pérdida de raíces que contribuyen al decaimiento (Hansen and Delatour 1999). Junto con ello, una vez que se observa exudación de resina en el cuello del árbol, canchros gomosos, con extensas áreas con tejido necrótico en la corteza interna, y una rápida

deseccación de la copa, producto del anillamiento del tejido conductor, terminan en la muerte del árbol (Rizzo *et al.*, 2002). En este estudio los aislamientos se realizaron directamente sobre el tejido cortical necrótico desde árboles sintomático que presentaban exudación de goma a distintas alturas, incluso por sobre los 2 m de altura, pudiendo hipotetizar un comportamiento aéreo del patógeno. A la fecha no existe información del posible carácter aéreo de *P. pseudosyringae* en *Nothofagus* spp. y menos aún en otras especies nativas. Sin embargo, en este estudio se tiene el primer reporte de *P. pseudosyringae* afectando hojas de una planta de regeneración de *P. lingue* en bosque nativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos, es posible establecer que plantas de las especies: *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *P. lingue*, *C. alba*, *P. boldus* y *S. macrocarpa* son susceptibles a *P. pseudosyringae*, en las condiciones de este estudio. La especie *N. obliqua* presentó mayor susceptibilidad comparado con las otras especies en la formación de canchros en tallo y lesiones foliares de mayor severidad. Además, se demostró un mayor potencial de esporulación en hojas, las que podrían servir como fuente de inóculo inicial, para luego causar canchros en fuste análogamente a lo relatado para SOD (Davidson *et al.*, 2005). Comportamiento similar se observó en *N. dombeyi*, pero con un desarrollo más lento de la infección de *P. pseudosyringae* en tallo y hojas y una menor capacidad de esporulación.

En el ensayo de inoculación de *P. pseudosyringae* en el tallo de las plantas, el avance de la lesión entre las especies fue limitado, no superando los 20 mm, observándose lesiones de menor tamaño a lo reportado por Fajardo *et al.* (2017), quienes obtuvieron tamaños de lesión entre 25-55 mm. A pesar de generarse canchros menores en las especies: *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *P. lingue*, la infección por el patógeno causó marchitamiento foliar seguido de la muerte de las plantas.

En este estudio también se determinó la capacidad de *P. pseudosyringae* de infectar hojas en ensayos *in vivo*. Las especies que resultaron ser susceptibles a la inoculación con zoosporas en las hojas de las plantas fueron *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba*, *P. lingue* y *P. boldus*; donde los síntomas en hojas correspondieron a necrosis discretas diferentes formas y tamaño (manchas foliares) y en algunos casos con formación de halos clóroticos en las lesiones de menor tamaño. Las lesiones se asocian frecuentemente a la porción distal de la hoja, ya que ahí es donde se conserva una película de agua por un mayor período de tiempo (Davidson *et*

al., 2008) luego del proceso de inoculación.

Las necrosis foliares en *N. obliqua* y *N. dombeyi* se caracterizaron por un rápido avance, observándose mayor severidad en las hojas de *N. obliqua*. Scanu *et al.* (2015) detectaron síntomas en hojas de *N. obliqua* tres días post-inoculación, igual período al registrado en este trabajo, y que finaliza con defoliaciones. Estas defoliaciones están asociadas a mayores índices de abscisión de hojas pequeñas, comparado con hojas de mayor tamaño que resisten alta actividad lumínica, siendo consistente con rasgos de las hojas con área foliar específica y capacidad fotosintética como parte de su estrategia de vida, que involucran mayores tasas de crecimiento, menor asignación de recursos a las defensas químicas o estructurales, y una respuesta de crecimiento flexible a daños en las hojas que involucran la rotación de las partes de la planta como método de defensa (Davidson *et al.*, 2011).

El área foliar afectada en hojas de roble fue notoriamente mayor, presentando mayor incidencia y susceptibilidad, que en el resto de las especies. En estudios realizados por Anaker *et al.* (2008), determinaron que el área de lesión foliar producida por *P. ramorum* se relaciona significativamente con el número de zoosporas y clamidosporas, sugiriéndose que se produce más inóculo a partir de lesiones de mayor tamaño, constituyendo un ciclo de vida policíclico donde interactúan las lesiones en crecimiento y las nuevas infecciones en las hojas y los árboles vecinos.

En hospederos susceptibles, las hifas crecen dentro del espacio intercelular y forman haustorios dentro del mesófilo, las hifas se ramifican rápidamente y colonizan, resultando en el desarrollo de la enfermedad (Kamoun, Huitema y Vleeshouwers, 1999), causando necrosis, bloqueando espacios intercelulares y tejido vascular, y secretando toxinas (Parke *et al.*, 2007). El patógeno termina afectando la tasa fotosintética, la respiración y el uso del agua del hospedero, tanto a nivel local como sistémico, provocando importantes gastos de energía para reprogramación celular y alterando el metabolismo, incluso en tejidos asintomáticos (Dileo *et al.*, 2009).

En los casos de *P. boldus*, *C. alba* y *P. lingue*, se observaron pequeñas lesiones en las hojas, lo que podría asociarse con una posterior acción de las estructuras post-formadas del huesped (Johnston *et al.*, 2015), pudiendo ser un indicador de una menor susceptibilidad, resistencia

parcial o como una respuesta de hipersensibilidad (Vleeshouwers *et al.*, 2000). Esta respuesta es inducida y el patógeno es contenido en un grupo de células muertas, produciendo síntomas necróticos visibles macroscópicamente, o impidiendo la penetración del patógeno en células epidermales, dependiendo de la interacción del patógeno-hospedero (Kamoun, Huitema y Vleeshouwers, 1999). *Phytophthora infestans*, por ejemplo, produce una reacción de hipersensibilidad en perejil una vez que penetra en el organismo no hospedero (Schmelzer *et al.*, 1995). La capacidad de *P. infestans* de penetrar células de diversas especies de plantas no solo Solanáceas indican que las respuestas de resistencia ocurren postpenetración (Vleeshouwers *et al.*, 2000), lo cual se atribuiría en este estudio a la aparición de pequeñas lesiones necróticas en las especies ya mencionadas.

En la inoculación realizada con el patógeno en hojas de plantas de lingue se observaron dos tipos de síntomas, (a) pequeñas manchas necróticas de número variable y (b) en hojas levemente coriáceas se produjeron heridas que permitieron el ingreso de *P. pseudosyringae* y el desarrollo de lesiones pequeñas que al unirse formaron lesiones de mayor tamaño. En hojas coriáceas altos niveles de taninos y aceites esenciales son acumulados en glándulas de la hoja, a lo largo de una gruesa cutícula (con cutina, ceras, compuestos fenólicos, pectinas y celulosa) limitando el ingreso de microorganismos en sus tejidos (Canhoto and Graca, 1999). Sumado a esta barrera estructural, existen reportes en *P. lingue* asociados a la producción de un compuesto fenólico con alta capacidad antimicrobiana que podría tener, hipotéticamente, cierta relación con los mecanismos de defensa constitutivos de la planta (Holler *et al.*, 2012) que podrían estar restringiendo el ingreso del patógeno en las hojas de *P. lingue*.

Independiente de la capacidad de *P. pseudosyringae* de provocar síntomas foliares en las especies en estudio, mediante bioensayo *in vitro* se estudió la posibilidad de esporulación del patógeno en hojas con necrosis y asintomáticas. Este potencial de esporulación en hojas permitiría establecer las especies que podrían tener un rol en el ciclo de enfermedad en el cancro de *Nothofagus*. En el estudio se determinó que en estomas de hojas de *S. macrocarpa*, *C. alba*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*, se forman esporangios del patógeno, pudiendo construir inóculo de *P. pseudosyringae* para las infecciones en fustes de los árboles de *Nothofagus*. Las hojas de *S. macrocarpa* se mantuvieron asintomáticas y se determinó la formación de hasta 20 esporangios/cm², entretanto en las especies *C. alba*, *N. dombeyi* y *N. obliqua*, en las cuales

el patógeno causo necrosis, desde la zona de avance se cuantificó entre 4-11 esporangios/cm². En comparación, en los resultados obtenidos por Scanu *et al.* (2015) se observó la formación de aproximadamente 1400 esporangios/cm² desde tejido necrosado y menos de 200 esporangios/cm² en hojas de *N. obliqua* y de *N. alpina*, respectivamente. Los altos niveles de esporulación obtenidos en inoculaciones de hojas *in vitro*, sugieren que la infección en el fuste observada en campo en Inglaterra probablemente también proviene de una alta producción natural de esporangios en las hojas de los sitios estudiados.

En ensayos realizados por Huberli *et al.* (2008) con inoculaciones *in vitro* de hojas de especies endémicas e introducidas en Nueva Zelanda con diferentes concentraciones de zoosporas de *P. ramorum*, la especie *Fuchsia excorticata* fue la más susceptible, presentando síntomas en todas las concentraciones probadas, con alto potencial de esporulación (65,3 esporangios/hoja), mayor porcentaje de re-aislamiento (39%) y la que presentó mayor severidad en hoja completa, similar a los resultados obtenidos en *N. obliqua* inoculado con *P. pseudosyringae*, en este estudio. Por otro lado, *Leptospermum scoparium* se comportó inicialmente como una especie no hospedera, no presentando síntomas y con un valor promedio de 12 esporangios/hoja, siendo re-aislada del tejido foliar, presentando un comportamiento similar a lo observado en plantas de *S. macrocarpa*.

Al igual que en este trabajo, Huberli *et al.* (2008) aislaron el patógeno desde todas las plantas inoculadas con *P. ramorum*, y se formaron esporangios en las hojas, aunque en bajo número, similar a los resultados obtenidos en hojas asintomáticas o con limitada aparición de síntomas en especies arbóreas y arbustivas en Inglaterra (Denman *et al.*, 2006). La ocurrencia de infecciones asintomáticas podría deberse a que el PI estuviese condicionado por variaciones en el tejido hospedero y la densidad de inóculo del patógeno, que determinaría la colonización del tejido y la aparición de síntomas (necróticos). En este sentido, algunas especies de *Phytophthora* pueden comportarse como hemibiotrofo, exhibiendo una fase como biotrofo bajo ciertas condiciones ambientales, las cuales al variar modifican el comportamiento del organismo hacia un estado como necrótrofo (Denman *et al.*, 2009). Según Huberli *et al.* (2008), las características de la hoja y condiciones lumínicas podrían influenciar el desarrollo de la infección. Inoculaciones de *P. ramorum* en hojas maduras, seleccionadas desde el lado soleado, donde la formación de epidermis es mayor, seguido de incubación en oscuridad

(condición no natural), podría disminuir la resistencia del hospedero, debido a que las hojas pueden reducir su tasa fotosintética y alteraciones en la apertura estomática. Por lo anterior, el nivel de esporulación e infección real de *P. pseudosyringae* debería comprobarse en condiciones de campo.

El desarrollo de la enfermedad puede involucrar varias o una única especie hospedera. En el primer caso, todos los hospederos pueden ser infectivos, es decir mantienen una producción de inóculo continua, o algunos de los hospederos no son infectivos, los que son definidos como hospederos terminales (Reisen 2010). La transmisión entre hospederos está regulada por la carga de esporas necesaria para infectar a un huésped final, por el potencial de esporulación del hospedero infectivo y por la movilidad propia de los propágulos infecciosos (Garbelotto *et al.*, 2017).

La esporulación de *P. ramorum* es afectada por las distintas propiedades del tejido foliar. Para este patógeno las hojas son la mayor fuente de inóculo comparado con los canchales, ya que en estos la esporulación ha sido raramente observada (Davidson *et al.*, 2005), y solo ocurre cuando trozos de madera de *N. densiflorus* y *Quercus agrifolia* son puestos a flotar en agua (Davidson and shaw 2003). Por otro lado, esporangios han sido observados en hoja frecuentemente, bajo condiciones naturales, así como en hojas que han sido retiradas desde la planta. Entonces, se entiende como infectivo aquel hospedero que posee la capacidad de esporular en hojas, y aquel que solo produce canchales es denominado hospedero terminal, por su incapacidad de generar nuevas infecciones.

Phytophthora ramorum comparte su distribución, sintomatología y rango de hospederos en Estados Unidos con *P. pseudosyringae*, condición que fue basada para utilizarse como modelo sobre el ciclo de enfermedad causada por *P. pseudosyringae* en bosque de *Nothofagus* en nuestro país. En California especies de *Quercus* y *U. californica* comparten una distribución simpátrica, es decir, coexisten en la misma distribución geográfica. La densidad espacial de *U. californica* promueve la dispersión de la enfermedad, actuando como el hospedero natural con mayor capacidad infectiva (Davidson *et al.*, 2005), junto con *N. densiflorus* en menor grado. En ambos casos, la infección y dispersión dependerá de la ocurrencia de lluvias formando una película de agua necesaria para la infección de *P. ramorum* (Garbelotto *et al.*, 2017). Las hojas de *U. californica* proporcionan el sustrato más prolífico para la esporulación

del patógeno, sin generar daños apreciables, además, este arbusto posee pocos genotipos dominantes que persisten a través del tiempo, lo cual es esperable cuando un hospedero es epidemiológicamente relevante (Eyre *et al.*, 2013). Estas poblaciones son afectadas por temperaturas estacionales y lluvia. Las infecciones en este patosistema requieren entonces una alta densidad poblacional de *U. californica* y la presencia de condiciones ambientales que conduzcan a la generación de altos niveles de esporulación.

En Nueva Zelanda, la especie *F. excorticata*, que es un árbol de 15 m de altura y común en bosques marginales, ha demostrado ser altamente susceptible al ataque de *P. ramorum* (Huberli *et al.*, 2008) y tendría la capacidad de dispersar el inóculo libremente, semejante a *U. californica*, y podría conducir una epidemia similar a la observada en SOD en California. Dentro de este patosistema como potencial hospedero actuaría *N. fusca*, el cual es susceptible a la formación de cancro, siendo entonces el hospedero terminal. Ambas especies *N. fusca* y *F. excorticata* comparten un extenso rango de distribución, por lo que importantes áreas en NZ están en latente riesgo frente a la posible introducción de *P. ramorum*.

En el presente estudio se determinó la presencia de *P. pseudosyringae* desde canchros en fuste de *N. obliqua*. En los sectores muestreados, en árboles de hasta 20 m altura se constataron canchros hasta 2 m de altura, siendo probable que esporangios caducos se liberen desde las hojas en presencia de lluvia y viento y se almacenen en la corteza irregular con profundas grietas hasta terminar en una infección aérea en altura, tal como ocurre con *N. densiflorus* en California y en Inglaterra con *P. pseudosyringae* (Scanu *et al.*, 2015). No fue estudiada la ocurrencia de infecciones aéreas de *P. pseudosyringae* en *N. obliqua* y *N. dombeyi* en campo, aunque en ensayos de laboratorio se ratificó el potencial de ambas especies para causar infección y esporular en tejido foliar.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se presentan algunas similitudes entre el ciclo descrito para SOD y la enfermedad causada por *P. pseudosyringae* en especies de *Nothofagus*: (a) El arbusto *S. macrocarpa* posee los mayores niveles de esporulación en hojas asintomáticas, y posee una distribución simpátrica a *N. obliqua*, pudiendo actuar como la principal fuente de inóculo. La especie se encontró asociada a roble en los dos sitios muestreados y no se observaron lesiones foliares en terreno. (b) Semejante al rol de *N. densiflorus*, las especies *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *C. alba* pueden ser fuentes de inóculo, aunque de menor relevancia, en

que el inóculo formado en sus hojas se disemina producto de la lluvia hacia el fuste del árbol, permaneciendo inactivo hasta que las condiciones sean adecuadas para desarrollar los canchros. A la fecha, a la única especie a la que se le podría atribuir un rol como huésped en terreno es *N. obliqua*, ya que se observaron canchros con exudación de goma, sin embargo, no se han observado lesiones en hoja ni esporulación del patógeno, debido a la imposibilidad de muestrear árboles sintomáticos en altura. Mientras que en las especies *N. dombeyi* y *C. alba* no se observaron síntomas en terreno. (c) La especie *P. lingue* correspondería al hospedero final, similar a *Quercus agrifolia* en USA, ya que demostró alta susceptibilidad en los ensayos de inoculación en tallo, aunque no desarrolló un alto potencial de esporulación, comparado con otras especies ensayadas. En campo, esta especie presentó canchros con exudación de goma en fuste de árboles, desde los cuales no se aisló el patógeno. En esta especie se detectó necrosis en hojas de plantas de regeneración, pero no se observaron síntomas equivalentes en árboles adultos. En los ensayos de esporulación se formaron pocos esporangios (1 a 2) en hojas, lo que podría deberse a condiciones ambientales inadecuadas para su formación, o porque simplemente el proceso naturalmente no ocurre.

Es importante considerar la alta capacidad de *P. ramorum* para diseminarse de forma aérea, la cual la diferencia de la mayoría de las especies de *Phytophthora* que afectan especies forestales y junto con ello, su capacidad de dispersarse en suelo y agua, la ubica en una categoría de extremo potencial de riesgo, cuando se encuentra en climas templados húmedos (Huberli *et al.*, 2008). En estudios anexos desarrollados por este equipo de trabajo (datos no publicados) *P. pseudosyringae* ha sido recuperada desde suelo y agua en bosques nativos de clima templado húmedo en Chile. Y si bien, ambas especies comparten una distribución similar en USA, *P. pseudosyringae* posee un potencial de daño limitado en ese país. Sin embargo, Scanu *et al.*, 2015 indican el alto potencial de riesgo de bioseguridad que podría producirse en bosques nativos de *Nothofagus* spp la presencia de *P. pseudosyringae*.

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen una primera aproximación a los posibles hospederos de *P. pseudosyringae* y su relación con el ciclo de la enfermedad. Es necesario realizar estudios más detallados respecto al ciclo de la enfermedad, para establecer el rol que cumplen las distintas especies arbóreas y arbustivas en el ciclo de *P. pseudosyringae*.

Desconocemos la naturaleza del patógeno para establecer si se encuentra naturalmente en los sectores o fue introducido, pero se tiene certeza de que se deben seguir realizando estudios que establezcan las medidas de manejo necesarias para evitar posibles daños en especies de interés del bosque nativo y determinar los factores ambientales que están influenciando el desarrollo de la enfermedad.



VI. CONCLUSIONES

- *Phytophthora pseudosyringae* se encuentra afectando rodales de *N. obliqua* en la Precordillera de Los Andes en la Región del Biobío generando el cancro gomoso de *Nothofagus* (CGN)
- *Phytophthora pseudosyringae* puede provocar canchros en tallos de plantas de *N. obliqua*, *N. dombeyi* y *P. lingue*, coincidiendo con lo verificado en campo con presencia de canchros gomosos en árboles *N. obliqua*.
- En plantas de *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba*, *P. lingue* y *P. boldus*, *P. pseudosyringae* causa necrosis foliar. Entretanto, en condiciones de campo, solo se verificó necrosis foliar en plantas de regeneración de *P. lingue*.
- En hojas de *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *C. alba* y *S. macrocarpa* el patógeno posee la capacidad de esporular, en tejidos necrosados o asintomáticos (*S. macrocarpa*), indicando una posible función en generar mayor cantidad de inóculo del patógeno en el ciclo de enfermedad en bosques de *Nothofagus* spp.
- *Nothofagus obliqua* y *N. dombeyi* fueron susceptibles en todas las condiciones estudiadas, y debido a su carácter de especies de interés forestal, deben continuar estudios epidemiológicos para comprender con mayor precisión el ciclo de la enfermedad causada por *P. pseudosyringae* y para adoptar las medidas de control más adecuadas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Anaker BL, NE Rank, D Huberli, M Garbelotto, S Gordon, T Harnik, R Whitkus and R Meetenmeyer. 2008. Susceptibility to *Phytophthora ramorum* in a key infectious host: landscape variation in host genotype, host phenotype, and environmental factors. *New Phytologist* 177(3):756-66
2. Brasier CM, S Denman, A Brown and JF Webber. 2004. Sudden oak death (*Phytophthora ramorum*) discovered on trees in Europe. *Mycological Research* 108: 1107–1110.
3. Canhoto C and MAS Graca. 1999. Leaf Barriers to Fungal Colonization and Shredders (*Tipula lateralis*) Consumption of Decomposing *Eucalyptus globulus*. *Microbial ecology* 37(3):163-172
4. Caripan H y V Gomez. 2003. Plan de desarrollo turístico de la comuna de Santa Juana. Universidad Austral de Chile. Memoria de Título. 254 pp.
5. CONAF. 2017. Superficies Catastros Usos de Suelos y Recursos Vegetacionales. Santiago, Chile. Código 1906. 7p
6. Davidson JM and GC Shaw. 2003. Pathways of movement for *Phytophthora ramorum*, the causal agent of Sudden Oak Death. Sudden Oak Death Online Symposium.

7. Davidson JM, AC Wickland, H Patterson, K Falk, and DM Rizzo. 2005. Transmission of *Phytophthora ramorum* in mixed-evergreen forests of California. *Phytopathology* 95:587-597.
8. Davidson JM, HA Patterson and DM Rizzo. 2008. Sources of inoculum for *Phytophthora ramorum* in a redwood forest. *Phytopathology* 98:860-866.
9. Davidson JM, HA Patterson, AC Wickland, EJ Fichtner and DM Rizzo. 2011. Forest Type Influences Transmission of *Phytophthora ramorum* in California Oak Woodlands. *Phytopathology* 101:492-501.
10. Denman S, E Moralejo, S Kirk, E Orton and J Webber. 2006. Sporulation of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* on asymptomatic foliage. *Plant Pathology* 96, S28
11. Denman S, SA Kirk, E Moralejo and J Webber. 2009. *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae* on naturally infected asymptomatic foliage. *EPPO Bulletin* 39: 105-111
12. Dick M, Williams N, Bader M, Gardner J, Bulman L. 2014. Pathogenicity of *Phytophthora pluvialis* to *Pinus radiata* and its relation with red needle cast disease in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 44(1):6.
13. Dileo MV, RM Bostock and DM Rizzo. 2009. *Phytophthora ramorum* does not cause physiologically significant systemic injury to California bay laurel, its primary reservoir host. *Phytopathology* 99:1307-1311.
14. Donoso C. 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque* 8(2):85-97

15. Drenth A and B Sendal. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection Brisbane Australia 42 pp.
16. Durán A, Gryzenhout M, Slippers B, Ahumada R, Rotella A, Flores F, Wingfield BD, Wingfield MJ. 2008. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology* 57:715–727.
17. Erwin DC. And OK Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul. 592 pp.
18. Eyre CA, M Kozanitas and M. Garbelotto. 2013. Population dynamics of aerial and terrestrial populations of *Phytophthora ramorum* in a California forest under different climatic conditions. *Phytopathology* 103:1141-1152.
19. Fajardo S. 2015. *Phytophthora pseudosyringae* asociada a la mortalidad en bosques de *Nothofagus* spp. del Centro – Sur de Chile. Universidad de Concepción. Tesis. 75 pp.
20. Fajardo S, S Valenzuela, AF Dos Santos, MP González and EA Sanfuentes. 2017. *Phytophthora pseudosyringae* associated with the mortality of *Nothofagus obliqua* in a pure stand in central-southern Chile. *Forest Pathology*. <https://doi.org/10.1111/efp.12361>
21. Gallegly E and C Hong. 2008. Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. United States. 158 pp.
22. Garbelotto M, D Schmidt, S Swain, K Hayden and G Lione. 2017. The ecology of infection between a transmissible and a dead-end host provides clues for the treatment of a plant disease. *Ecosphere* 8(5) 10.1002/ecs2.1815.

23. González G. and A. Opazo. 2002. Enfermedades fungosas y otras. Disponible en Baldini A and L. Pancel. Agentes de daño en el bosque nativo. Universitaria 408 pp.
24. Green S, CM Brasier, A Schelzing, A McCracken, GA MacAskill, M Wilson and JF Webber. 2013. The destructive invasive pathogen *Phytophthora lateralis* found on *Chamaecyparis lawsoniana* across the UK. Forest Pathology 43:19-28. Greslebin A, EM Hansen, LM Winton and M Rachenberg. 2005. *Phytophthora* species from soil and streams of declining *Austrocedrus chilensis* forests in Patagonia, Argentina. Mycologia 97:218–228.
25. Greslebin A, EM Hansen and W Sutton. 2007. *Phytophthora austrocedrae* sp. nov., a new species associated with *Austrocedrus chilensis* mortality in Patagonia (Argentina). Mycological Research 3:308-316.
26. Hansen E and P Hamm. 1996. Survival of *Phytophthora lateralis* in infected roots of Port Oxford Cedar. Plant Disease 80: 1075-1078
27. Hansen E and C Delatour. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. Annals of Forest Science 56:539–547.
28. Hansen EM, JLP Parke and W Sutton. 2005. Susceptibility of Oregon Forest Trees and Shrubs to *Phytophthora ramorum*: A Comparison of Artificial Inoculation and Natural Infection. Plant disease 89:63-70.
29. Hansen E. 2008. Alien forest pathogens: *Phytophthora* species are changing world forests. Boreal Environment Research 13: 33-41 pp.
30. Heenan PB and RD Smitsen. 2013. Revised circumscription of *Nothofagus* and recognition of the segregate genera *Fuscospora*, *Lophozonia*, and *Trisyngyne* (Nothofagaceae). Phytotaxa 146: 1-31
31. Ho HH, HC Zeng and FC Zheng. 2002. *Phytophthora insolita* on Hainan Island.

Botanical Bulletin of Academia Sinica 43:227–230

32. Holler JG, SB Christensen, HC Slotved, HB Rasmussen, A Guzman, CE Olsen, B Petersen and P Mølgaard. 2012. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:1138–1144.
33. Huberli D, B Lutzy, B Voss, M Calver, M Ormsby and M Garbelotto. 2008. Susceptibility of New Zealand flora to *Phytophthora ramorum* and pathogen sporulation potential: an approach based on the precautionary principle. *Australasian Plant Pathology* 37:615-625
34. Hwang J, SW Oak and SN Jeffers. 2008. Detecting *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* in streams in natural ecosystems using baiting and filtration methods. In: Frankel SJ, JT Kliejunas and KM Palmieri. 2008. Proceedings of the Sudden Oak Death 3rd Science Symposium. USDA Forest Service General Technical Reports. PSW-GTR-214. 55–58 pp.
35. Johnston SF, MF Cohen, T Torok, RK Meentemeyer and NE Rank. 2015. Host phenology and leaf effects on susceptibility of California bay laurel to *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 106:47-55.
36. Jung T, H Blaschke and W Oßwald. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49: 706–718
37. Jung T, J Nechwatal, DEL Cooke, G Hartmann, M Blaschke, WF Oßwald, JM Duncan and C Delatour. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107:772-789.
38. Kamoun S, E Huitema and VGAA Vleeshouwers. 1999. Resistance to oomycetes: a

- general role for the hypersensitive response?. Trends in Plant Science Perspective 4:196-200.
39. King KM, AR Harris and JF Webber. 2015. In plant detection used to define the distribution of the European lineages of *Phytophthora ramorum* on larch (*Larix*) in the UK. Plant Pathology Doi: 10.1 111/ppa.12345
40. Kroon L, H Brouwer, A de Cock, F Govers. 2012. The genus *Phytophthora* Anno 2012. Phytopathology 102: 348-364.
41. Lamour K. 2013. *Phytophthora* – a global perspective. CABI Plant Protection Series. K Lamour, University of Tennessee, Knoxville, USA. 256 pp.
42. Lionello P, P Malanotte-Rizzoli, R Boscolo, P Alpert, V Artale, L Li, J Luterbacher, W May, R Trigo, M Tsimplis, U Ulbrich and E Xoplaki. 2006. The mediterranean climate: an overview of the main characteristics and issues. In Mediterranean climate variability. Editorial Elsevier. Italia. 438 pp.
43. Linzer RE, DM Rizzo, SO Cacciola and M Garbelotto. 2009. AFLPs detect low genetic diversity for *Phytophthora nemorosa* and *P. pseudosyringae* in the US and Europe. Mycological Research 113:298–307.
44. Luebert F and P Plischoff. 2006. Sinopsis climática y vegetal de Chile. Editorial Universitaria. Chile. 316 pp.
45. Martin FN and PW Tooley. 2003. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa* and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. Mycological research 107:1379-1391.
46. Martinez R. 2004. Mapa de reconocimiento de suelos de la VIII Región del Bío-Bío sector Sur. Universidad de Chile. Memoria de Título. 174 pp

47. Motta E, T Annesi, A Pane, DEL Cooke and SO Cacciola. 2003. A new *Phytophthora* sp. causing a basal canker on beech in Italy. *Plant Disease* 87: 1055.
48. Parke JL, E Oh, S Voelker, EM Hansen, G Buckles and B Lachenbruch. 2007. *Phytophthora ramorum* colonizes roble moreno xylem and is associated with reduced stem water transport. *Phytopathology*. 97:1558-1567.
49. Pintos-Varela C, JP Mansilla Vázquez, O Aguín-Casal, C Rial-Martínez. 2007. First Report of *Phytophthora pseudosyringae* on Chestnut Nursery Stock in Spain. *Plant Disease* 91: 1517.
50. Reisen WK. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology* 55:461-483.
51. Rizzo DM, M Garbelotto, JM Davidson, GW Slaughter and S Koike. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86: 205-214.
52. Rizzo DM, M Garbelotto and EM Hansen. 2005. *Phytophthora ramorum*: integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forests. *Annual Review of Phytopathology* 43: 309-335.
53. Sansford, C 2012, 'Revised Rapid Assessment of the need for a detailed Pest Risk Analysis for *Phytophthora pseudosyringae*', Food and Environment Research Agency (FERA) Consultado en Diciembre 2014. Disponible en <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/phytophthoraPseudosyringae0312.pdf>.
55. Scanu B, BT Linaldeddu and A Franceschini. 2010. First report of *Phytophthora pseudosyringae* associated with ink disease of *Castanea sativa* in Italy. *Plant Disease* 94: 1068.

56. Scanu B, B Jones and JF Webber. 2012. A new disease of *Nothofagus* in Britain caused by *Phytophthora pseudosyringae*. *New Disease Reports* 25, 27.
57. Scanu B and JF Webber. 2015. Dieback and mortality of *Nothofagus* in Britain: ecology, pathogenicity and sporulation potential of the causal agent *Phytophthora pseudosyringae*. *Plant pathology*. DOI: 10.1111/ppa.12399.
58. Schena L, JM Duncan and DEL Cooke. 2008. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57:64-75.
59. Schmelzer E, B Naton, S Freytag, I Rouhara, B Kuester and K Hahlbrock. 1995. Infection-induced rapid cell death in plants: a means of efficient pathogen defense. *Can J Bot* 73:426-434.
- Schena L, JM Duncan and DEL Cooke. 2008. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57:64-75.
60. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2008. Balance de gestión integral año 2008. Santiago de Chile. 91 pp.
61. Stamps DJ, GM Waterhouse, FJ Newhook and GS Hall. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological Papers* 162:1–28
62. Sutton W and EM Hansen. 2002. *Phytophthoras* in Oregon forests. In: *Phytophthora* in forests and natural ecosystems. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, West Australia. Oct 2001. McComb JA, Hardy GE StJ, Tommerup IC. Murdoch Univ Press. 274 pp.
63. Sutton W, EM Hansen, PW Reeser and A Kanaskie. 2009. Stream monitoring for detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon roble moreno forests. *Plant Disease* 93:1182–1186

64. Vleeshouwers VG, W Van Dooijeweert, F Goovers, S. Kamoun and LT Colon. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* 210: 853-864.
65. Waterhouse GM. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* 92:22.
66. Waterhouse GM, FJ Newhook and DJ Stamps. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. (Eds. DC Erwin, S Battnicki-Carcia and PH Tsao). The American Phytopathological Society, St Paul. Minnesota, 139-147.
67. Weste G and GC Marks. 1987. The Biology of *Phytophthora cinnamomi* in Australasian Forests. *Annual Review of Phytopathology* 25: 207-229.
68. Wickland A, C Jensen and D Rizzo. 2008. Geographic distribution, disease symptoms and pathogenicity of *Phytophthora nemorosa* and *Phytophthora pseudosyringae* in California, USA. *Forest Pathology* 38: 288-298.